

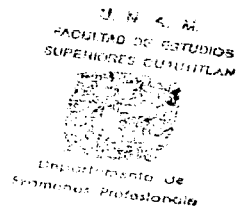
A

10524
12



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN



IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO (BIOLUMINISCENCIA)
PARA LA APROBACIÓN MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS DE
CUIDADO ORAL."

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

IGNACIO CEJA VEGA

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. MARCELA HERNÁNDEZ VARGAS

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

B



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E**

**ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Implementación de un método rápido (Bioluminiscencia) para la aprobación
microbiológica de productos de cuidado oral.

que presenta El pasante: Ignacio Ceja Vega
con número de cuenta: 08857420-0 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Octubre de 2002

PRESIDENTE	<u>Dra Susana E. Mendoza Elvira</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Salvador Zambrano Martínez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Héctor Coss Garduño</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ma de Jesús Rodríguez Cadena</u>	

B

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A DIOS:

Por darme lo más preciado, la vida. El mañana no le está asegurado a nadie, joven o viejo. Hoy puede ser la última vez que veas a los que amas. Por eso no esperes más, hazlo hoy, ya que si el mañana nunca llega, seguramente lamentarás el día que no tomaste tiempo para una sonrisa, un abrazo, un beso y que estuviste muy ocupado para concederles un último deseo. Mantén a los que amas cerca de ti, díles al oído lo mucho que los necesitas, quíérelos y trátalos bien, toma tiempo para decirles "lo siento", "perdóname", "por favor", "gracias" y todas las palabras de amor que conoces. "El principio de la sabiduría es el temor a Dios"

A MIS PADRES:

Porque con su amor supieron guiarme en el camino de la honradez y la honestidad. Porque me enseñaron que no podemos obligar a nadie a querernos. Lo más que podemos hacer es merecer ser queridos. El resto depende de cada quien.

Porque me enseñaron que lo que cuenta no es cuanto tienes en tu vida, sino lo que tienes en tu vida.

Porque me enseñaron que lo importante no es lo que nos pasa, sino lo que hacemos al respecto.

Porque me enseñaron que somos responsables de lo que hacemos, pensemos lo que pensemos.

Porque me enseñaron que no siempre es suficiente ser perdonado por los demás. A veces es necesario que nos perdonemos a nosotros mismos.

Porque me enseñaron que las credenciales en la pared no nos transforman en un ser humano con valores.

Porque me enseñaron que un título universitario no es prueba que hemos aprendido.

Porque me enseñaron que la verdadera felicidad viene de las cosas que no nos pueden quitar.

Porque me enseñaron que los hacedores cometen errores. Los que no hacen nada siempre están exentos de cometerlos.

Porque me enseñaron que el éxito es un camino, no un destino.

Porque me enseñaron que dos de las cosas más difíciles de manejar en la vida son el éxito y el fracaso.

Por hacer de mí una persona de bien.

Gracias.

A MIS PROFESORES

A cada uno de ellos que desde mi infancia fueron transmitiéndome su conocimiento. Mi compromiso es hacer uso correcto de ello.

D

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.UNAM

Porque me abrió sus puertas de manera incondicional para darme las herramientas a través del conocimiento para enfrentar la vida.

A MARCE:

Por todo el apoyo incondicional que me has brindado. Gracias.

No puedo darte soluciones para todos los problemas de la vida, ni tengo respuesta para tus dudas o temores, pero puedo escucharte y buscarlas junto contigo.

No puedo evitar que tropieces, solamente puedo ofrecerte mi mano para que te sujetes y no caigas.

No puedo evitar tus sufrimientos cuando alguna pena te rompa el corazón, pero puedo llorar contigo y recoger los pedazos para armarlo de nuevo.

No puedo decirte quién eres ni quién deberías de ser, solamente puedo quererte como eres y ser tu amigo.

A MIS AMIGOS

Roberto, Paty, Mazu, Rubén (Chucky), Chuy, Sonia,y los que faltaron... ..

En estos días me puse a recordar a mis amistades que son como el tesoro máspreciado. No estaban arriba, ni abajo, ni en medio, no encabezaban ni concluían las listas, no eran el número uno ni el número final, lo que sé es que destacaban por alguna cualidad que transmitían y con la cuál desde hace tiempo se ennoblece mi vida; y tampoco tengo la pretensión de ser el primero , el segundo o el último de la lista , basta que me quieran como amigo.

A MIS SINODALES

Por su tiempo y sus valiosas aportaciones. Gracias

A LUCY

Por permitir compartir mi vida a tu lado.

Quien ama de verdad da todo de sí por hacer feliz a su amado. Sólo el que aprende a dar desinteresadamente esta en el camino de descubrir la verdadera felicidad .

A MIS TESOROS

Andrea, Sofia Alexandra y al bebé por ser la fuerza para seguir adelante. Doy gracias a Jehová mi Dios y a su hijo Jesús por darme un regalo tan especial, mis hijas. Sólo pido tener la sabiduría, paciencia y buen juicio para hacer de mi regalo divino un buen trabajo.

D

INDICE	CONTENIDO	PAGINA
1.0 Resumen		4
2.0 Introducción		5
2.1 Bioluminiscencia aplicada en el análisis microbiológico		5
2.1.1 Metabolismo bacteriano		6
2.2. Generalidades de la bioluminiscencia		8
2.3 Diversidad de la bioluminiscencia		11
2.3.1 Fuentes de luciferina (luciérnaga)		13
2.3.2 Luciferasa		13
3.0 Objetivos		15
3.1 Objetivo general		15
3.2 Objetivos particulares		15
4.0 Justificación		16
5.0 Material y equipo		17
5.1 Reactivos		17
5.2 Material de laboratorio		17
5.3 Aparatos		17
5.4 Material biológico		17
6.0 Metodología		18
6.1 Estudio de la eficiencia del analista		18
6.2 Estudio de determinación de biocarga		20
6.3 Estudio del efecto de la muestra		22
6.3.1 Prueba		22
6.3.1 Formulas para determinar el efecto de la muestra		22
6.4 Estudio de la validación con microorganismos.		24
6.4.1 Preparación del inóculo		24
6.4.2 Estudio de inoculación.		24
6.5 Estudio en paralelo entre el método tradicional microbiológico y el método de bioluminiscencia.		31
6.5.1 Método de bioluminiscencia		31
6.5.2 Método tradicional		31
7.0 Resultados		33
8.0 Discusión		66
8.1 Eficiencia del analista.		66
8.3 Efecto de la muestra		66
8.4 Validación con microorganismos.		66
8.5 Estudio en paralelo.		67
9.0 Conclusiones.		68
10.0 Apéndices.		69
10.1 Caldo TAT		66
10.2 Agar nutritivo		66
10.3 Agar soya triticasa		66
10.4 Agar Letheen modificado		66
10.5 Agar sales manitol.		69
10.6 Agar para aislamiento de <i>Pseudomonas</i>		70

10.7 Agar dextrosa sabouraud	67
10.8 Agar Biggy	67
10.9 Agar MacConkey	67
10.10 Solución salina al 0.85%	67
10.11 Reactivos de bioluminiscencia	70
10.12 Ensayos previos a la lectura de las muestras por bioluminiscencia.	71
10.13 Parámetros de los ensayos de verificación.	72
10.14 Formato y fórmula para el cálculo del efecto de la muestra.	72
11.0 Glosario	74
12.0 Bibliografía	75

INDICE DE DIAGRAMAS Y TABLAS

DIAGRAMA A Reacción genérica quimioluminiscente	9
DIAGRAMA B Transferencia de energía para la emisión de luz	9
DIAGRAMA C Reacción general de bioluminiscencia	10
DIAGRAMA D Molécula de Luciferina y dehidroluciferina de luciérnaga.	13
DIAGRAMA E Estudio de eficiencia del analista	19
DIAGRAMA F Prueba de biocarga	21
DIAGRAMA G Prueba del efecto de la muestra	23
DIAGRAMA H Preparación del inóculo.	27
DIAGRAMA I Preparación del inóculo continuación.	28
DIAGRAMA J Estudio de validación con microorganismos.Dia 1	29
DIAGRAMA K Estudio de validación con microorganismos.Lectura de las muestras.	30
DIAGRAMA L Método de prueba.Estudio en paralelo	32
DIAGRAMA M Preparación de los medios	73
TABLA 1 Clasificación de los organismos bioluminiscentes.	11
TABLA 2 Sistemas bioluminiscentes	12
TABLA 3 Resultados del estudio de la eficiencia del analista.	33
TABLA 4 Resultados del estudio de biocarga (Factibilidad)	33
TABLA 5 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 1	34
TABLA 6 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 2	35
TABLA 7 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 3	36
TABLA 8 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 4	37
TABLA 9 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 5	38
TABLA 10 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 6	39
TABLA 11 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 7	40
TABLA 12 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 8	41
TABLA 13 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 9	42
TABLA 14 Resultados del estudio del efecto de la muestra del producto de prueba 10	43
TABLA 15 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 1	44
TABLA 16 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 2	45
TABLA 17 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 3	46
TABLA 18 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 4	47
TABLA 19 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 5	48
TABLA 20 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 6	49
TABLA 21 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 7	50
TABLA 22 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 8	51

INDICE DE DIAGRAMAS Y TABLAS (continua...)

TABLA 23 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 9	52
TABLA 24 Resultados del estudio de validación con microorganismos del producto de prueba 10	53
TABLA 25 Resultados de identificación de <i>C albicans</i> . Sistema API 20C AUX	54
TABLA 26 Resultados de identificación de <i>S aureus</i> . Sistema API Staph.	54
TABLA 27 Resultados de identificación de <i>Ps aeruginosa</i> . Sistema API 20 NE.	55
TABLA 28. Resultados de identificación de <i>B. cepacia</i> . Sistema API 20 NE.	55
TABLA 29 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 1	56
TABLA 30 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 2	57
TABLA 31 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 3	58
TABLA 32 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 4	59
TABLA 33 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 5	60
TABLA 34 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 6	61
TABLA 35 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 7	62
TABLA 36 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 8	63
TABLA 37 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 9	64
TABLA 38 Resultados del estudio entre el método tradicional y el de bioluminiscencia del producto de prueba 10	65

1.0 RESUMEN

En este trabajo se estudiaron 10 fórmulas diferentes de cuidado oral, con la finalidad de implementar un método microbiológico alternativo que disminuyera el tiempo de cuarentena, y generara ahorros.

Para determinar la factibilidad de implementar el método de bioluminiscencia como un método de rutina para la liberación de producto terminado de diferentes formulaciones de cuidado oral, se procesaron 100 muestras por cada fórmula, encontrándose un porcentaje menor al 10% de repeticiones, lo que indicó que los niveles de limpieza de la planta son adecuados.

Debido a que la reacción de bioluminiscencia es altamente sensible y requiere de ATP para llevarse a cabo, se realizó por cada fórmula un estudio del efecto de muestra sobre la reacción, con el fin de descartar fuentes de ATP de origen no microbiano o componentes de la fórmula que interfieran con dicha reacción; ninguna fórmula demostró contener ATP de origen no microbiano, o algún componente que interfiera con la reacción.

Como parte del proceso de validación de este método también se llevó a cabo el desafío de cada fórmula con microorganismos de prueba, para ello se utilizaron las siguientes cepas de referencia ATCC: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. La finalidad de este estudio radicó en determinar si el método es capaz de detectar bajas concentraciones de microorganismos; en todas las fórmulas desafiadas hubo recuperación de los microorganismos inoculados.

Por último se compararon los métodos de bioluminiscencia y cuenta en placa, utilizando para ello 30 muestras por fórmula producidas durante 10 días. Estas muestras se analizaron por ambos métodos dentro de las primeras 8 hrs de ser manufacturadas. En todos los casos se encontró concruencia en los resultados.

Los diferentes estudios de validación realizados para la implementación de método de bioluminiscencia mostraron que esta tecnología puede ser aplicada con las ventajas de obtener resultados confiables en menor tiempo.

2.0 INTRODUCCION

2.1 BIOLUMINISCENCIA APLICADA EN ANALISIS MICROBIOLÓGICOS

Los métodos tradicionales de análisis microbiológicos aplicados a diversos productos susceptibles de contaminación microbiana han cambiado muy poco desde que el proceso fuera introducido hacia finales del siglo XIX, es decir, que las muestras de productos son cultivadas en una placa de agar e incubadas durante un periodo de hasta 7 días para obtener resultados. Durante el proceso de incubación, el producto en análisis, y el capital que este representa, permanece inactivo en las bodegas sin ser distribuido a las cadenas de consumo, por lo cual esta demora puede llegar a representar un gasto de manufactura importante. Sin embargo, un costo elevado no implica siempre niveles de precisión altos. (17, 18, 19, 32, 41)

Generalmente los métodos tradicionales se basan en el recuento de colonias y la identificación posterior de microorganismos objetables, los cuales están sujetos a errores humanos. La tecnología de bioluminiscencia está dirigida específicamente a la aceleración y mejora en la exactitud de los análisis microbiológicos. (16, 21, 26, 28, 39)

Todos los organismos vivos utilizan y/o contienen ATP, y sólo se necesitan niveles muy bajos de los mismo para activar la reacción de bioluminiscencia, lo cual permite al sistema detectar niveles muchos bajos de microbios en las muestras durante las primeras 24 horas. (22, 23, 25, 43)

Dentro de las ventajas que ofrece esta tecnología se mencionan (21):

- Una detección más rápida de microorganismos con respecto a los métodos tradicionales en placas de agar.
- Mayor sensibilidad del método, detecta 1000 microorganismos contra 10,000,000 que forman una colonia de organismos.
- Los resultados de prueba son más rápidos; 24-48 hrs contra 5 - 7 días por lo menos.
- La valoración cualitativa del contenido microbiano se basa principalmente en una prueba de esterilidad.
- Al liberarse la producción en menor tiempo, reduce el tiempo de inventarios detenidos por cuarentenas, y por consiguiente genera ahorros.
- Enzima luciferasa es específica para la hidrólisis de ATP
- Dado que la molécula de ATP es químicamente idéntica en todos los organismos se puede detectar una amplia gama de microorganismos entre los que se incluyen Bacterias, hongos y levaduras (40)

Todo método de análisis presenta también desventajas, que al final se evalúan y se comparan con las ventajas para establecer la factibilidad de su implementación. Las desventajas que se han observado con este método son (27):

- No es un método cuantitativo
- No detecta un microorganismo en específico.
- El costo de la prueba puede resultar más alto con respecto a los métodos tradicionales.

2.1.1 METABOLISMO BACTERIANO

Todas las células vivas requieren agua y ciertos nutrientes para crecer y dividirse. Entre las sustancias inorgánicas (oligoelementos) se incluyen iones como Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} y Fe^{+3} , que actúan como cofactores en una variedad de procesos enzimáticos. De modo similar el Na^{+2} es esencial para ciertos sistemas de transporte de nutrientes. El fósforo (en forma de PO_4) es un constituyente esencial de los nucleótidos y fosfolípidos, mientras que el azufre se encuentra en ciertas coenzimas (ejemplo Acetil-CoA), así como en dos de los aminoácidos. De forma semejante, una fuente de nitrógeno (como NH_4^+ o como compuestos nitrogenados orgánicos) es esencial para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos. Por último el oxígeno forma parte de diversas sustancias esenciales y además actúa en su forma elemental como aceptor final de electrones para la respiración aerobia, el proceso mediante el cual se produce energía en forma de ATP.

Entre las sustancias orgánicas necesarias para el crecimiento, cabe citar a los carbohidratos, que intervienen en la producción de energía y la estructura celular, los aminoácidos y nucleótidos que representan los bloques fundamentales para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y los lípidos, que son los componentes mayores de la membrana celular. Por último las vitaminas actúan como cofactores para ciertas reacciones enzimáticas.

Todas las células requieren un suministro de energía para sobrevivir. Esa energía típicamente en forma de ATP, procede del catabolismo ordenado de varios sustratos orgánicos (carbohidratos, lípidos y proteínas). El proceso de descomposición de sustratos y conversión en energía utilizable se conoce como catabolismo. La energía producida se puede usar después para la síntesis de constituyentes celulares, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos, un proceso conocido como anabolismo. El conjunto de esos dos procesos, íntimamente relacionados e integrados, se denomina metabolismo intermediario.

Las vías metabólicas específicas usadas por las bacterias para descomponer y sintetizar sustratos orgánicos son muy similares para todas las células vivas (procarióticas y eucarióticas). Esas semejanzas proporcionan la base para el concepto de unidad bioquímica (la química de todas las formas de vida es esencialmente la misma y los mecanismos para síntesis de energía como ATP, síntesis y funcionamiento del código genético e identificación de las vías metabólicas para degradar los hidratos de carbono, las proteínas y los lípidos, son en esencia idénticas).

El proceso metabólico comienza en general con la hidrólisis de macromoléculas grandes en el medio ambiente celular externo por enzimas específicas o exoenzimas. Las pequeñas moléculas producidas (monosacáridos, péptidos de cadena corta y ácidos grasos) pueden ser transportadas después al citoplasma, donde serán convertidas a través de una o más vías en un producto intermediario universal común, el ácido pirúvico. Utilizando el ácido pirúvico, los carbohidratos procedentes de los nutrientes importados, pueden ser canalizados hacia la producción de energía o hacia la síntesis de nuevos hidratos de carbono, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos. (30,31,49).

Para utilizar la bioluminiscencia como un método microbiológico alternativo para liberar producto terminado, primero es necesario comprobar que es reproducible con respecto a los métodos tradicionales en placa, dado que las características fisicoquímicas de un producto pueden interferir en la reacción de bioluminiscencia, o el producto a analizar contenga extractos naturales y por consiguiente de manera intrínseca tenga un alto contenido de ATP y genere falsos positivos; las fuentes de ATP no microbiano son (29,36,37) :

- ATP libre -suspendido en el medio, o residuos biológicos
- ATP somático dentro de las células no microbianas (ej. células epiteliales)
- ATP ligado a agregados de proteínas fuera de la célula (ej. micelas de caseína en leche ó en glóbulos de grasa).

.Por lo anterior es necesario validar el método de bioluminiscencia , en diferentes aspectos (24,38,43,44,45,46,48):

Validar la eficiencia del analista (**Estudio de eficiencia del analista**). Este estudio es realizado para asegurar que la persona que maneja la muestra lo hace de manera aséptica, y para asegurar las condiciones microbiológicas del medio ambiente

Asegurarse que la muestra a analizar no interfiera con la reacción de Bioluminiscencia (**Efecto de la muestra**). Esta prueba Consiste en detectar si el producto a analizar contiene ATP de origen no microbiano, y determinar si la muestra contiene algún componente que interfiera con la reacción.

Determinación de Biocarga (**Análisis de factibilidad**): Este estudio tiene como finalidad verificar las condiciones de limpieza con las que se fabrica un producto y determinar la frecuencia con la que deberá repetirse el análisis de la muestra si no se conoce la causa raíz de la biocarga en un producto y se corrige por medio de programas de Control Microbiológico

Estudio de Bioluminiscencia con microorganismos: Consiste en el desafío del producto con diferentes microorganismos de prueba, y determinar si el método es capaz de detectarlos.

Estudio en paralelo del producto terminado. Consiste en determinar si los métodos tradicionales y de bioluminiscencia son equicomparables en el proceso de liberación de un producto terminado .

2.2 GENERALIDADES DE LA BIOLUMINISCENCIA

La bioluminiscencia, ha sido conocida desde la antigüedad, Aristóteles (384-322 A.C.) describió la bioluminiscencia en los peces muertos (debido a las bacterias) y de algunos hongos; Roberto Boyle en 1667, descubrió con su campana neumática, que el oxígeno estaba íntimamente ligado al fenómeno cuando probó que: " la luz procedente de la madera en putrefacción disminuía conforme se evacuaba aire. (1,2)

En su "Origen de las especies " Darwin (1859) menciona brevemente a la bioluminiscencia en la sección intitulada "Dificultades especiales de la teoría de la selección natural" (3)
En 1887 Dubois, describió la presencia de dos sustancias responsables de la luminiscencia de *Pholas dactylus* (una almeja) y encontró que una de ellas era termoestable (el sustrato llamado luciferina) y la otra termolábil (la enzima llamada luciferasa) (4).

Harvey en 1932, argumentó que, pese al poco conocimiento acerca de los componentes y de los mecanismos de las reacciones bioluminiscentes, en organismos simples (bacterias y hongos) la producción de la luz está relacionada con el mecanismo de la respiración celular.

El mismo Harvey en 1957, completó el experimento de Boyle al permitir la entrada de aire al interior de la campana y observó que la luz, aparentemente extinguida, revivía rápidamente. (4)

Por otra parte, el conocimiento acerca de la quimioluminiscencia tiene poco tiempo, ya que es hasta finales del siglo XIX, en que se publican los descubrimientos fortuitos de sustancias quimioluminiscentes como son la lofina y el pirogalol y hasta 1928 y 1934 son descubiertas sustancias quimioluminiscentes como el luminol y la luciferina (4,2)

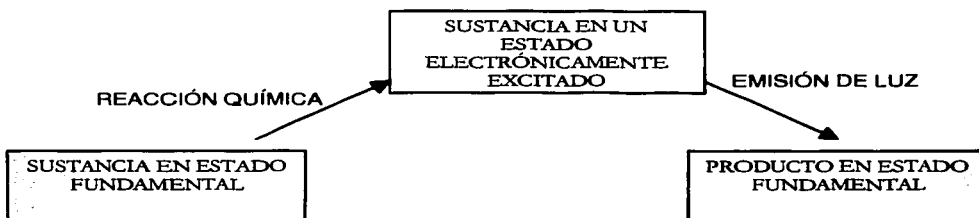
Una característica importante de la bioluminiscencia y de la quimioluminiscencia, es que pueden ser utilizadas en técnicas analíticas aplicándolas a disciplinas tales como la química analítica, la parasitología, la microbiología, la hematología, la farmacología y la inmunología. (1,5,6).

La bioluminiscencia y la quimioluminiscencia han tenido impacto en la química clínica como sustitutos de las reacciones colorimétricas de sustratos de oxidasas y deshidrogenasas. En este tipo de ensayos, la sensibilidad de la reacción quimioluminiscente puede ser usada, ya sea para cuantificar sustratos que no son fácilmente medibles por otras técnicas o para reducir las cantidades de muestra y/o reactivos, disminuyendo con ello los costos de las pruebas. (7)

La Luminiscencia se presenta cuando una sustancia se excita energéticamente y después al regresar a su estado fundamental, disipa la energía absorbida en forma de luz. Existen varias formas de luminiscencia, los electrones a un nivel de energía más alto y son:

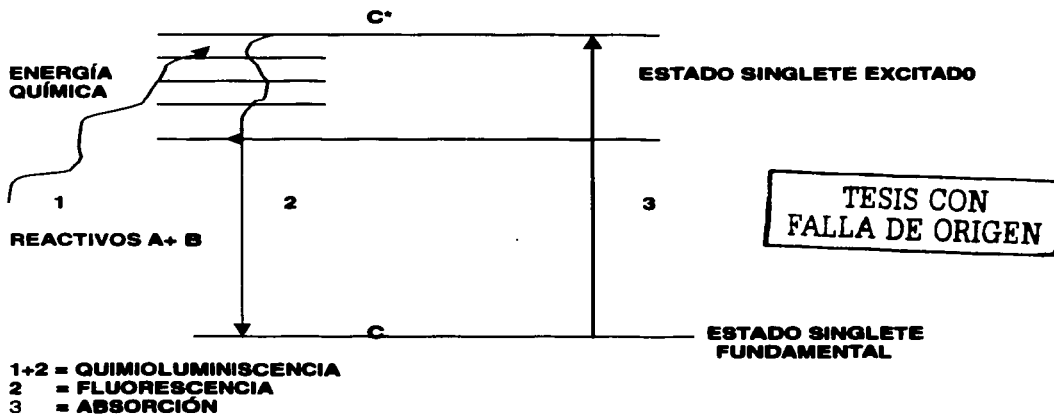
- a) Radioluminiscencia: Donde la excitación la realizan rayos beta o gamma.
- b) Fluorescencia/Fosforescencia: Donde la excitación la producen fotones de luz infrarroja, visible o luz ultravioleta.
- c) Quimioluminiscencia: Donde la activación la efectúa una reacción química que ocurre cuando una molécula emite un fotón como resultado de una reacción química exergónica, en la cual uno de los intermediarios o productos finales se deja en un estado de excitación. Este fenómeno ocurre adiabáticamente y sin absorción de luz, ya que se requiere una gran cantidad de energía para producir un fotón (aproximadamente 200 kilojoules). La mayoría de las reacciones quimioluminiscentes son de tipo oxidativo.

DIAGRAMA A. REACCIÓN GENÉRICA QUIMIOLUMINISCENTE



Usualmente, la emisión de luz se genera a partir de un estado de singlete excitado, y ocurre con un amplio rango de eficiencia. La quimioluminiscencia sensibilizada resulta cuando un producto excitado transfiere su energía a otra sustancia que posee características fluorescentes. (5,7,8,35)

DIAGRAMA B. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA PARA LA EMISIÓN DE LUZ



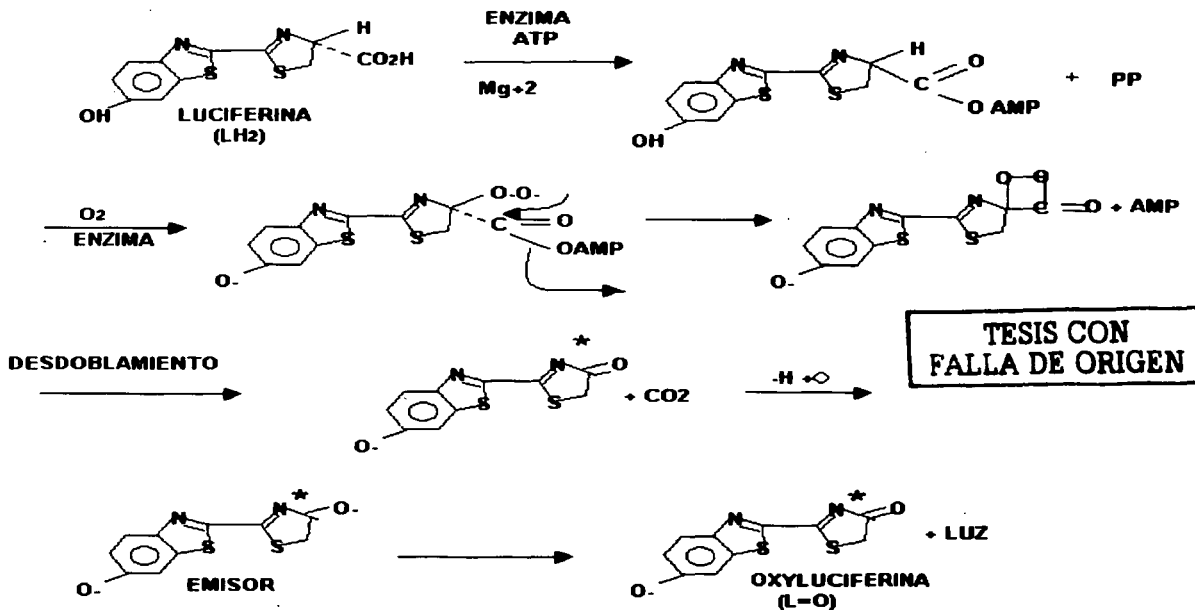
- d) La Bioluminiscencia es un caso especial de quimioluminiscencia y se le da este nombre por encontrarse en organismos vivos.

En la bioluminiscencia, las reacciones químicas están catalizadas por una enzima denominada "luciferasa", la cual crea un ambiente favorable para la oxidación luminiscente de un sustrato específico designado como "luciferina" (7,5).

El paso inicial de la reacción es la rápida conversión en presencia de magnesio (Mg^{+2}), ATP (Adenosin trifosfato) y luciferasa de la luciferina a luciferiladenilato, el cual en presencia de la misma enzima se combina con oxígeno molecular para dar un peróxido intermediario (3,2,9)

El siguiente paso es la formación del anillo del peróxido y la ruptura del mismo, para producir CO_2 y un carbonilo excitado, el cual sufre una eliminación de protones (sin pérdida de excitación) para generar la especie emisora. Después de la emisión de luz en el producto final la oxiluciferina (4,9,10,11,12,34)

DIAGRAMA C REACCIÓN GENERAL DE BIOLUMINISCENCIA



Generalmente la eficiencia cuántica en las reacciones quimioluminiscentes tiene un rango de 1-1.5%; mientras que las reacciones bioluminiscentes más eficientes se aproxima al 100% (2,5,6,7)

2.3 DIVERSIDAD Y FUNCIONES DE LA BIOLUMINISCENCIA.

Una gran cantidad de organismos están dotados con la habilidad para emitir luz, exhibirla y controlarla en una variedad de formas (3,9,11).

Los animales luminosos son más comunes de lo que pudiera suponerse y ejemplos de estos organismos tienen una distribución muy amplia y muy variada.

TABLA 1 CLASIFICACIÓN DE ORGANISMOS BIOLUMINISCENTES (6)

Bacterias	Hongos	Plantas	Animales
<i>Photobacterium fisheri</i>	<i>Ompjalía.</i>	<i>Noctiluca</i>	<i>Photinus pyralis</i>
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	<i>Xylaria</i>	<i>Gonyaulax</i>	<i>Aequorea aequorea</i>
<i>Photobacterium liognathi</i>	<i>Armillaria</i>	<i>Pyrodinium</i>	<i>Pelagia</i>
<i>Vibrio cholera</i>			<i>Balanoglossus</i>
<i>Beneckea harvevi</i>			<i>Psychodera</i>
<i>Beneckea splendida</i>			<i>Renilla reniformis</i>
			<i>Cypridina hilgendorffii</i>
			<i>Pholas dactylus</i>
			<i>Latia neritoides,</i>
			<i>Arachnocampa luminosa.</i>
			<i>Diplocardia longa</i>

La bioluminiscencia aparece más comúnmente en los organismos marinos, entre los que hay una amplia variedad que va desde las bacterias microscópicas y el planctón, hasta varias especies de peces (únicos vertebrados luminiscentes) (4,11)

Los organismos de tierra luminiscentes y que son más conocidos son la luciernaga y el gusano de luz, aunque también deben de incluirse a las bacterias y hongos. (10).

En los organismos superiores la función de la bioluminiscencia es como medio de comunicación, como en el caso de las luciernagas que la utilizan para distinguir la especie y el sexo; otros organismos la utilizan para disimular su presencia como es el caso del pez *Argyrops leucus*, el cual iguala la luz ambiental para disfrazar su silueta.

En general la bioluminiscencia es usada para el cortejo, comunicación, diferenciación de sexo, distracción de depredadores, camuflaje, búsqueda y atracción de la presa (10,11)

Las diferentes funciones de la bioluminiscencia, pueden ser clasificadas en tres categorías:

a) DEFENSA. Ayuda a evitar a los depredadores.

Para asustar	Medusa, dinoflagelados.
Alarma	Dinoflagelados
Camuflaje	<i>Argyropelecus</i> , Calamar
Visión	Pez linterna

b) ATAQUE. Ayuda a la depredación.

Atracción	Pejesapo
Fototactismo	Gusano de luz de Nueva Zelanda, pez linterna.
Camuflaje	Calamar
Visión	Pez linterna, <i>Pachystomias</i> .

c) COMUNICACIÓN Intraespecies

Cortejo, apareamiento Luciernaga, pez linterna, gusano de luz de las Bermudas.

Por otra parte, es difícil colocar en cualquiera de las categorías anteriores la función de la bioluminiscencia en las bacterias y el hecho de que en algunas bacterias luminiscentes el contenido de luciferasa se aproxima al 5% de la proteína total, no puede ser un suceso fortuito. Actualmente se considera que la bioluminiscencia bacteriana tiene como funciones la adquisición de nutrientes y de un nicho adecuado (13)

No existe un sistema químico que sirva como modelo para todos los organismos, ya que la mayoría de las luciferinas tienen diferentes estructuras químicas y un amplio rango de pesos moleculares y diferentes mecanismos de reacción catalítica (1,4)

Una dificultad para realizar un estudio apropiado de los mecanismos que emplean los organismos bioluminiscentes es la mínima cantidad de material activo que se puede obtener; como por ejemplo, 30,000 luciérnagas sólo producen 15 mg de luciferina pura, 5 toneladas de *Aequorea* proporcionan 100 mg de proteína activa y de unos 40,000 ejemplares del antozoo *Renilla reniformis* sólo 0.5 mg de luciferina pura (4)

TABLA 2. SISTEMAS BIOLUMINISCENTES (3)

Organismos luminosos	Luciferasas (PM)	Emisión máxima (nm)
Bacterias (Photobacterium, Vibrio)	80,000	495-500
Dinoflagelados (Gonyaulax, Pyrocystis)	420,000	475
Celentérados (Aequorea, Renilla)	21,000	460-490
Anélidos (Diplocardia)	300,000	500
Moluscos (Latia)	170,000	500
Crustáceos (Cypridina)	68,000	465
Insectos (Photinus, Photuris)	100,000	560

2.3.1 Fuentes de luciferina (Luciérnaga)

El acopio de organismos para el estudio químico de los mecanismos intrínsecos, es un problema importante en el campo de la bioluminiscencia, pero la luciérnaga es más visible y capturable que la mayoría de los otros organismos, por ello ha sido el sistema bioluminiscente más intensamente estudiado.

La mayor parte del trabajo sobre luciérnagas se ha realizado con una especie norteamericana *Photinus pyralis*, pero los componentes esenciales de la reacción luminosa son comunes a todas las demás especies hasta ahora examinadas. (9,12,42)

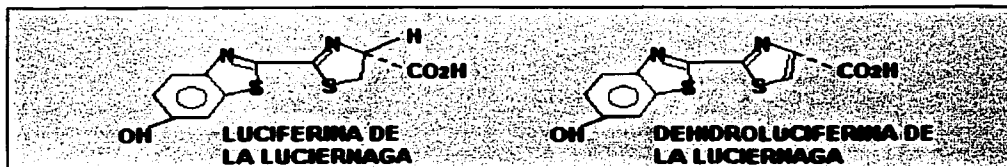
El *Photinus pyralis* emite luz *in vivo* con un máximo de 562 nm, aunque otras especies utilizan la misma luciferina emiten en el intervalo comprendido entre 550 y 575 nm. La luciérnaga es uno de los organismos bioluminiscentes más eficientes, ya que su rendimiento cuántico es del 88% (9,12,42)

La luciferina fue aislada por primera vez en cantidades adecuadas por Bitler y McElroy y su estructura fue determinada y demostrada gracias a su síntesis total realizada por White.

La luciferina tiene una pobre estabilidad, siendo fácilmente oxidada a dehidroluciferina, la cuál puede reaccionar con ATP pero es incapaz de producir luminiscencia.(9)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMA D. MOLÉCULA DE LUCIFERINA Y DEHIDROLUCIFERINA DE LA LUCIERNAGA



2.3.2 La luciferasa

La luciferasa tiene un peso molecular de 100,000 daltones y consiste en dos subunidades de un peso molecular de 50,000 daltones cada una, a bajas concentraciones la molécula está siempre disociada; las subunidades de la enzima son similares pero no idénticas (5,6,33)

Especificidad: La luciferasa de la luciérnaga sólo cataliza la oxidación luminiscente de la luciferina de la luciérnaga, y ésta reacción depende de la presencia de ATP, iones Mg⁺² y oxígeno molecular.

Activadores: Son activadores el Mg⁺², la luciferina y el ATP- El Manganeso puede reemplazar al magnesio, el cobalto y el hierro son considerablemente menos activos. Compuestos fosforilados que pueden reemplazar al ATP como son el Adenosin difosfato (ADP) y Uridil difosfato (UTP).

Inhibidores: La enzima es fuertemente inhibida por el pirofosfato, varias aminas, cobre y p-cloromercuribenzoato, la inhibición de éste último puede ser inhibida por glutatión.

Benzimidazol, benzotriazol y derivados sustitutos inhiben la reacción por competencia con la luciferina.

La actividad de la luciferasa de la luciérnaga es muy sensitiva a la inhibición por aniones específicos.

El orden de la eficacia de la inhibición por los aniones es $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$.

Temperatura y pH: El pH óptimo de la actividad es de 7.8 y la intensidad máxima de luz se observa a 25-26°C. (47)

Estabilidad: La enzima purificada es estable a 4°C pero pierde su actividad por repetidas congelaciones y descongelaciones. La enzima se desnaturaliza por burbujeo de aire a través de la solución o por exposición a superficies tales como tiras de celofán o perlas de vidrio. La actividad se pierde rápidamente por diálisis y no puede ser restaurada por el dializado o por extracto crudo hervido. (14,15)

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Implementar un método microbiológico rápido y equivalente al método tradicional de cuenta en placa, utilizando la bioluminiscencia para la liberación de producto terminado .

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Demostrar que el método de Bioluminiscencia es equivalente al método de detección tradicional a través de los diferentes estudios de validación (Efecto de la muestra, desafío con microorganismos, estudio en paralelo) para optimizar el tiempo de liberación de producto terminado.
- ❖ Reconocer las buenas prácticas de manufactura a través del estudio de factibilidad para la implementación del metodo bioluminiscente.
- ❖ Demostrar que los resultados obtenidos en el estudio en paralelo cumplen con las especificaciones microbiológicas indicadas en la ley general de salud para la liberación de producto terminado (50)

4.0 JUSTIFICACION

Debido a que en las empresas que se dedican a la manufactura de diferentes productos en serie, se requieren espacios de bodegas, mejorar los tiempos de distribución de sus productos, disminuir sus costos de transportación, disminuir inventarios, optimizar recursos humanos, los cuales representan altos costos; para ello se requieren de métodos microbiológicos con tendencia a reducir los tiempos de cuarentena de aquellos productos sensibles a contaminación microbiológica.

Por lo tanto se propone en el presente trabajo la validación de un método rápido, que soporte las especificaciones microbiológicas de producto terminado de cuidado oral y que sea equivalente a los métodos tradicionales de análisis.

5.0 MATERIAL y EQUIPO

5.1 REACTIVOS

- Reactivo liberador de ATP LuminEx
- Reactivo de Bioluminiscencia LuminaATE
- Reactivo de ATP Control Positivo
- Reactivos para lavado y enjuague del equipo
- Caldo (TAT) Triptona Azolectina Tween
- Tween 20
- Agar Soya Tripticasa (AST)
- Agar dextrosa sabouraud
- Agar MacConkey
- Agar para aislamiento de *Pseudomonas* (PIA)
- Agar Biggy
- Agar Leetheen modificado
- Agar nutritivo
- Agar sales manitol
- Agua destilada o desionizada, para la preparación de los medios

5.2 MATERIAL GENERAL DEL LABORATORIO

Contenedores estériles con tapa de rosca (150 ml / 11 cm x 4cm de diámetro)

- Gradilla para Tubos de lectura.
- Celdas desechables de Lectura para luminómetro
- Micropipetas:
 - 5-50 μ l
 - 40-200 μ l
 - 200 -1000 μ l
- Puntas para pipetas estériles.
 - 5-200 μ l
 - 300-1000 μ l
- Material de vidriería dedicado para la preparación de medios de cultivo.
- Placas Petri estériles.
- Pipetas estériles de 1, 2 & 10 ml
- Asas bacteriológicas
- Tubos de ensayo

5.3 EQUIPO

- Luminómetro
- Incubador con agitación ajustada a $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ y 200-220 r.p.m.
- Autoclave
- Balanza
- Campana de Flujo laminar.
- Incubador ajustado $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$
- Incubador ajustado $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$
- Baño de agua ajustado a $46^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.4 MATERIAL BIOLÓGICO

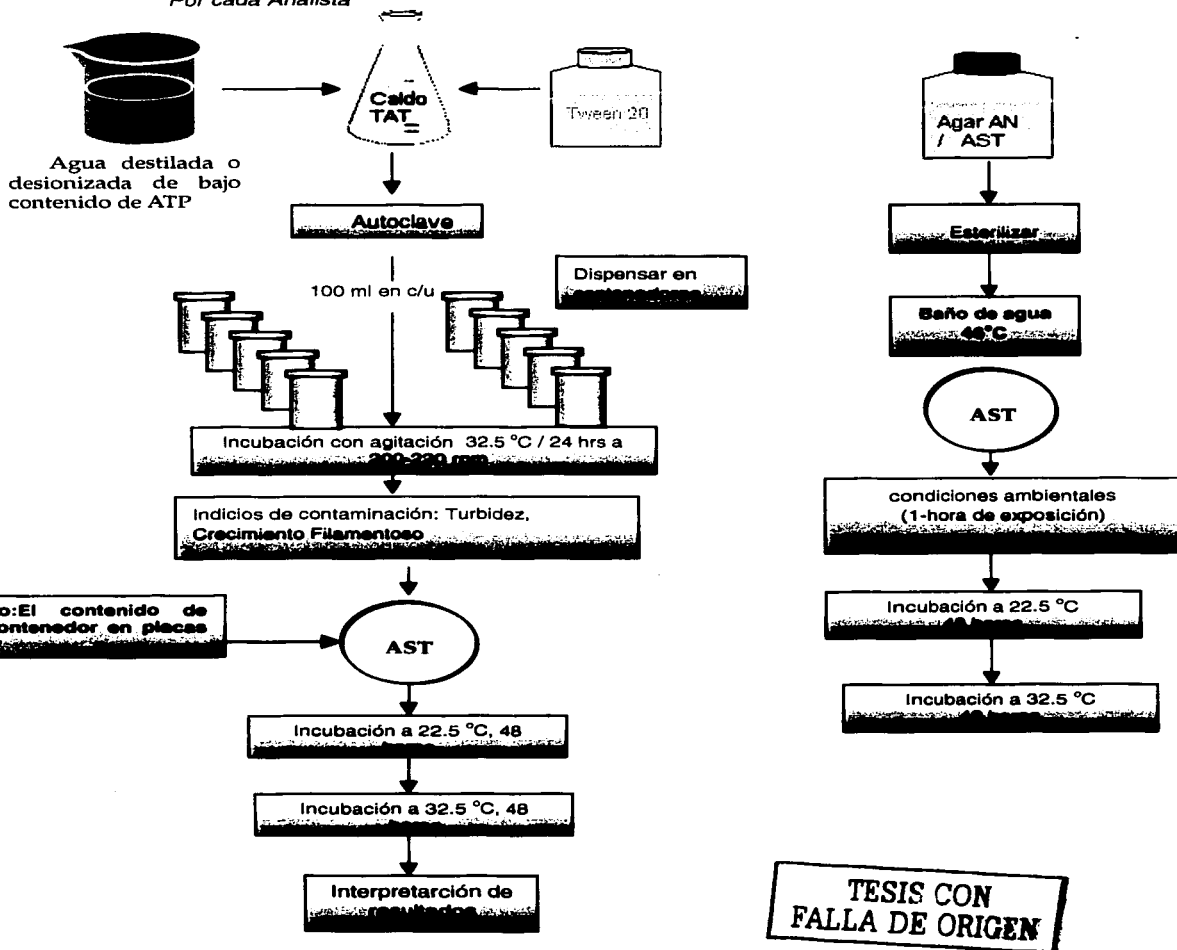
- *Burkholderia cepacia* ATCC 25416
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231

6.0 METODOLOGIA

6.1 ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DEL ANALISTA

6.1.1 En una campana de flujo laminar, se transfirieron asépticamente 100 ml de caldo TAT en 10 contenedores estériles.

- i. Durante este paso se verificaron las condiciones ambientales mediante la exposición de placas de AST en el área de trabajo.
- ii. Las placas permanecieron expuestas durante el tiempo de preparación de los contenedores con el caldo TAT y hasta alcanzar un tiempo de una hora, antes de ser incubadas por 48 horas a 22.5°C y después 48 horas a 32.5°C.
- iii. Posteriormente se incubarán los contenedores con el caldo TAT a 32.5°C en un incubador con agitación a 200- 220 r.p.m.
- iv. Visualmente se verificó algún indicio contaminación como turbidez de el caldo o filamentos de crecimiento microbiano.
- v. Se estrió cada muestra de caldo TAT sobre placas de agar AST, para confirmar la presencia o ausencia de contaminación. Se incubaron las placas por 48 horas a 22.5°C y 48 horas más a 32.5°C.
- vi. Adicional al estriado en placas de AST, las muestras de caldo TAT fueron evaluadas por el método de Bioluminiscencia con el fin de determinar la capacidad del analista para usar una micropipeta. Cada muestra fue corrida por duplicado para obtener un coeficiente de variación (CV) el cual debe ser <10%.
- vii. Registrar los resultados

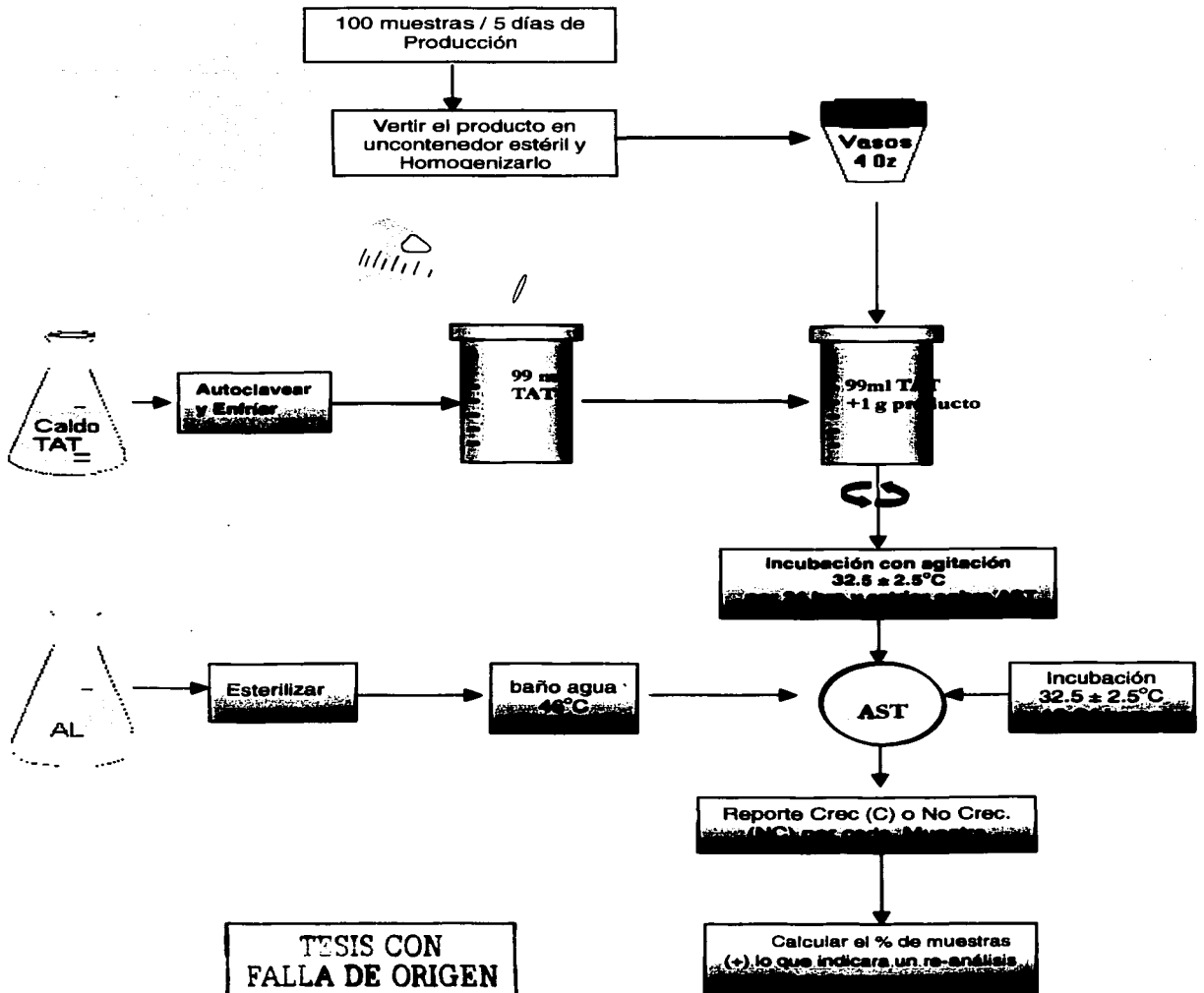
DIAGRAMA E: ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DEL ANALISTA.*Por cada Analista*

6.2 ESTUDIO DE LA BIOCARGA (ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD)

Procedimiento de la prueba.

- a) En este estudio se requirieron para el análisis 100 muestras de producto terminado. Las muestras fueron colectadas en un periodo de 5 días de producción (20 por día con intervalos de 1 hora)
- b) Todas las muestras fueron analizadas antes de tener 8 horas de haber sido producidas.
- c) Cada es vaciada completamente en un contenedor estéril y homogenizada.
- d) Asépticamente se peso un gramo de producto en 99 ml de caldo TAT en un contenedor estéril.
- e) Cada uno de los contenedores fue incubado con agitación a 32.5°C y 200-220 r.p.m durante 24 horas.
- f) Por último se estrió el contenido de cada contenedor sobre placas de agar Soya triptica
- g) Se incubaron las cajas estriadas de 18-24hrs. a 32.5°C .

DIAGRAMA F: PRUEBA DE BIOCARGA



6.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MUESTRA

6.3.1 Método de Prueba.

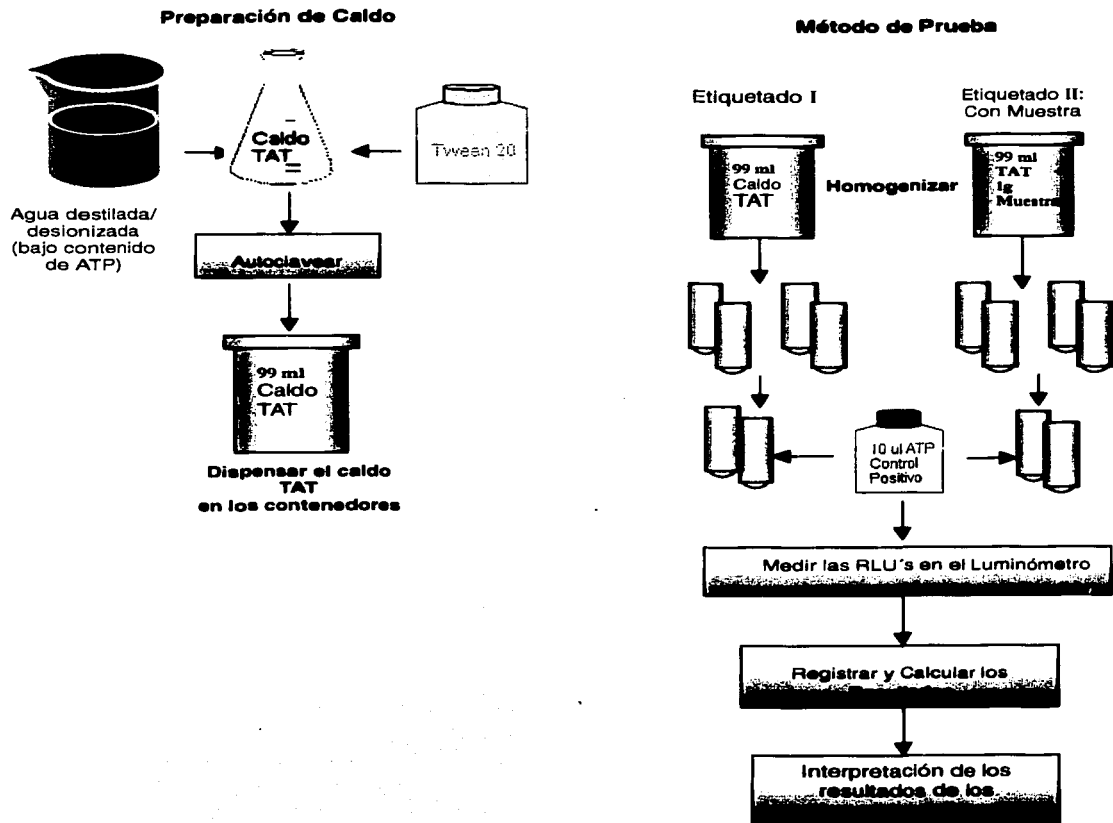
- a) Para cada fórmula de producto se prepararon previamente dos contenedores estériles con 99 ml cada uno de caldo TAT estéril. Se etiquetaron como "I" para caldo solo y "II" para caldo solo más muestra. Posteriormente, asépticamente se pesaron 1 g de la muestra dentro del contenedor II
- b) Se agitó el contenedor II para asegurar que los contenidos es uniforme. Asépticamente se transfirieron alicuotas de 50µl caldo TAT del contenedor "I" dentro de cada uno de cuatro tubos de lectura. Posteriormente se adicionaron 10 µl de ATP a dos de los tubos antes preparados.
- c) Se repitió lo indicado en el inciso b) para el contenedor II. Esto dió ocho (8) tubos de lectura.
- d) Se leyeron las muestras en el luminómetro. Ver apéndice 9.10, 9.11 y se compararon con las especificaciones de prueba. Ver apéndice 9.12
- e) Se realizaron los cálculos requeridos para determinar si el producto a analizar por el método de bioluminiscencia contenía ATP de origen no microbiano, y para determinar si existía alguna interferencia con la reacción de bioluminiscencia. Ver apéndice 9.13

6.3.2. Fórmulas para determinar el efecto de la muestra

Ver apéndice 9.13

1987-1988
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIAGRAMA G: PRUEBA DEL EFECTO DE LA MUESTRA



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.4 ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMO

6.4.1 Preparación del Inoculo.

- a) Un día antes de iniciar la prueba, a partir de tubos de conservación se transfirieron cada uno de los microorganismos (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*) a caldo Soya tripticasa (CST) para su enriquecimiento a 30°C por 24 horas.
- b) Posteriormente cada microorganismo fué estriado sobre placas de AST, las cuales fueron incubadas a 30°C. por 24 horas.

Nota: *Candida albicans* fué transferida a SDA

- c) A partir de los cultivos de 24 horas, se inoculó una asada de cada microorganismo en tubos con 9 ml de solución salina estéril al 0.85%.
 - i. Visualmente se ajustó la turbidez de la solución del cultivo con el tubo # 0.5 del nefelómetro de McFarland que equivale aproximadamente a 1.5×10^8 bacterias / ml y 1.5×10^4 / ml para *Candida albicans*.
 - ii. A partir de la suspensiones de microorganismos se prepararon diluciones decimales seriadas excepto de *Bacillus subtilis*, en solución salina estéril al 0.85% para alcanzar una concentración teórica de 1000 ufc por ml en donde 10 μ l contienen 10 microorganismos.
 - iii. Para *Bacillus subtilis* se preparó una dilución seriada en solución salina estéril al 0.85% para alcanzar un inoculo con una concentración aproximada de 100,000 ufc por ml. A partir de esta dilución se tomarón 4.5 ml y se transfirieron a tubos con 5.5 ml de solución salina al 0.85% para alcanzar una concentración teórica de 4.5×10^7 ufc por ml en donde 10 μ l contienen 450 microorganismos.
 - iv. Para verificar el número de microorganismos inoculados, de cada suspensión de se vertieron 100 μ l en una caja petri estéril por duplicado, se adicionó AST, se homogenizó y se dejaron solidificar las placas. Para *Candida albicans* se utilizó SDA.
 - v. Las placas fueron incubadas 24-48 horas a 30°C.
 - vi. Posteriormente se contaron las unidades formadoras de colonia sobre las placas y se calculó el número de microorganismos

6.4.2 Inoculación de las Muestras

- a) Por cada fórmula se probaron 3 lotes diferentes de producto, los cuales fueron inoculados con cada uno de los 5 microorganismos de prueba.
- b) Día uno.
 - i. Para cada muestra, asépticamente se adicionó 1 g de producto a 99 ml de caldo TAT.
 - ii. Después se inocularon 10 μ l de la suspensión del inoculo preparado en 3.b,c, d. Este paso fue repetido para cada uno de los 5 microorganismos.

- iii. Control del inóculo. Para este control se prepararon 5 contenedores con 99 ml de caldo TAT a los cuales se les inoculó por separado 10µl de cada uno de los microorganismos antes mencionados, con el fin de verificar la viabilidad de los microorganismos de prueba.
- iv. Control negativo de la muestra: Para todas las muestras, asépticamente se adicionó 1 g de producto a 99 ml de caldo TAT.
- v. Control Negativo. Para el control Negativo de Caldo, se preparón dos contenedores con 99 ml de caldo TAT.

Nota: El lote de caldo TAT debe ser el mismo tanto para los controles, como para las muestras problema.

- vi. Las muestras y los controles se incubarán a 30°C, a 200-220 r.p.m., por 24 Horas.

Día Dos

- vii. Preparación del equipo de acuerdo al apéndice 9.10, 9.11 y 9.12
 - i. Se corrieron los controles para determinar el fondo de luz, control de reactivos de bioluminiscencia, control de ATP y control de caldo(Ver apéndice 9.11)
 - ii. Una vez verificados los controles se procedió a la lectura de las pruebas de la siguiente manera:
 - iii. Lectura del caldo TAT solo
 - iv. Lectura de las muestras de producto + caldo TAT
 - v. Lectura de caldo TAT + microorganismo
 - vi. Lectura de la muestra de producto + caldo TAT + microorganismo

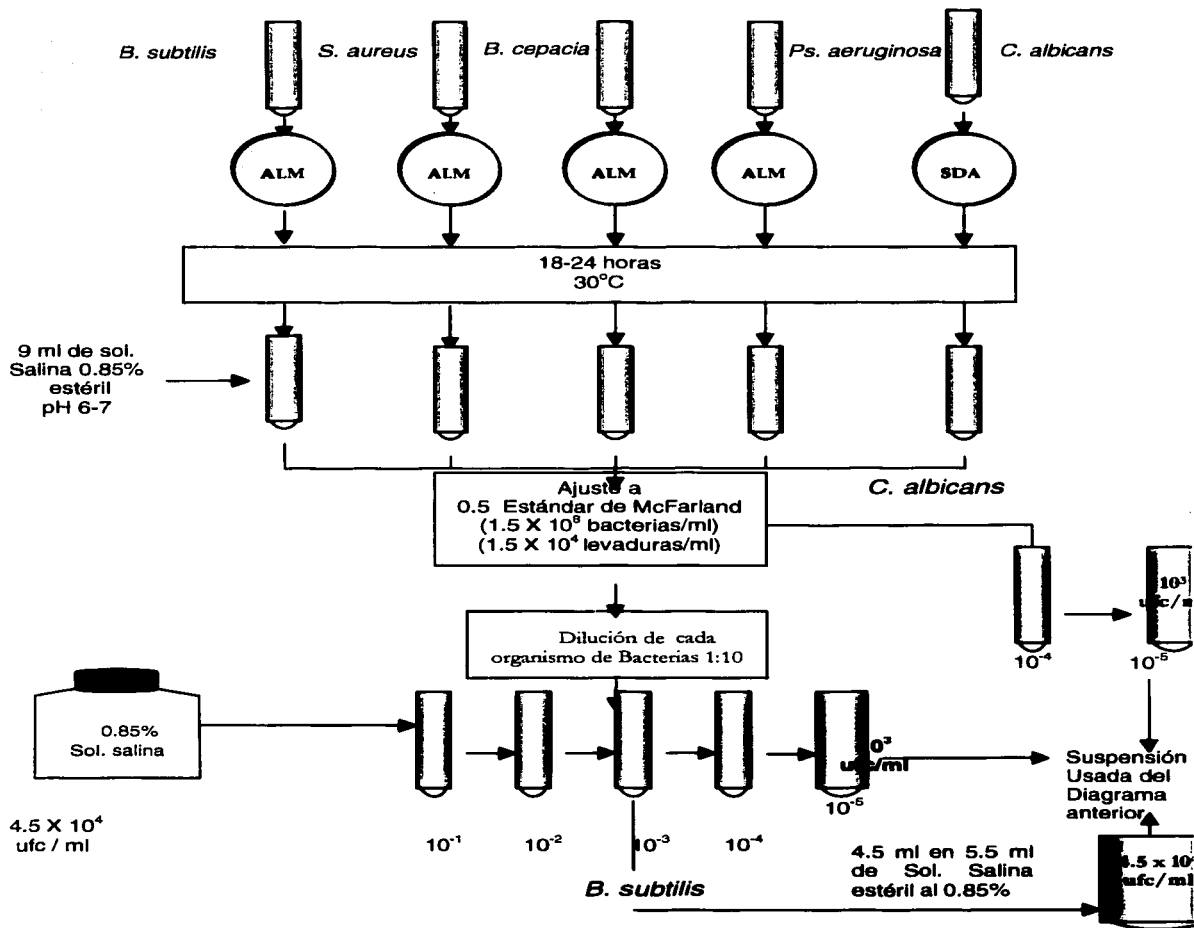
Nota: Para cada muestra se tomaron alícuotas de 50 µl por duplicado y se colocaron en los tubos para su lectura

- vii. Posteriormente ,se transfirieron alícuotas de 50 µl de las muestras de prueba incubadas (inoculadas con microorganismos) por duplicado en dos tubos de lectura. Los tubos de lectura se colocaron dentro del Luminómetro y se corrieron las muestras.(Ver apéndice 9.11 y 9.12)
- viii. Por último,después de leer las muestras,se limpiaron y drenaron los inyectores del luminómetro,para evitar cualquier tipo de contaminación en las líneas.
 - Con la finalidad de comprobar la presencia de los microorganismos inoculados, cada una de las muestras fueron estriadas a partir del TAT de enriquecimiento de 24 horas sobre placas de AST, ASM, MAC, PIA, y se incubaron toda la noche a 30°C.En el caso *Candida albicans* se utilizó SDA y Biggy. Para *Bacillus subtilis* se estrió solamente sobre AST y se realizó una tinción de Gram para confirmar los bacilos Gram positivos. A partir de las placas de AST se corrieron las bioquímicas correspondiente de los microorganismos utilizados mediante el sistema microestandarizado API 20 NE,API Staph y API 20C AUX; los resultados se muestran en las tablas 25, 26, 27 y 28.

c) Día Tres

- i. **Checar la confirmación del estriado de las placas del Día 2 para crecimiento e identificación. Registrar los resultados como positivos o negativos y confirmar la identificación del organismo.**

DIAGRAMA H: - PREPARACIÓN DEL INOCULO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMA I- PREPARACIÓN DEL INÓCULO CONTINUACIÓN- CUENTA UTILIZADA

Organismos preparados:

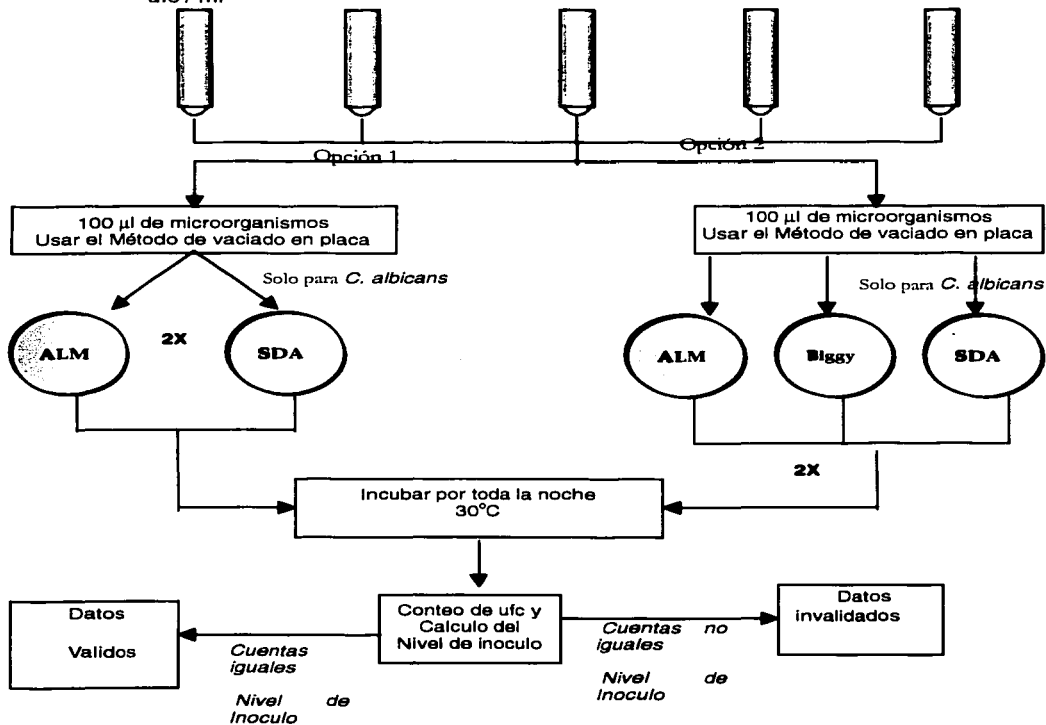
B. subtilis
4.5 X 10⁴
ufc / ml

B. cepacia
10³ ufc / ml

P. aeruginosa
10³ ufc/ml

S. aureus
10³ ufc/ml

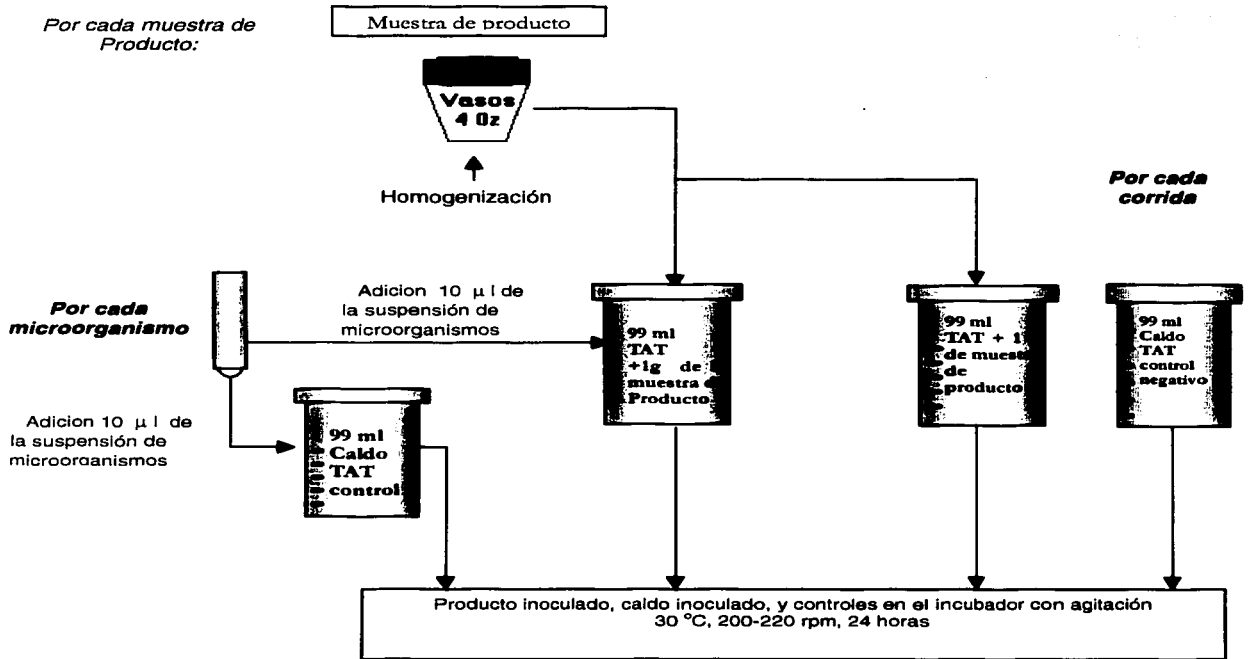
C. albicans
10³ ufc / ml



TSIS 011
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMA J : ESTUDIO DE VALIDACIÓN CON MICROORGANISMOS.DIA 1

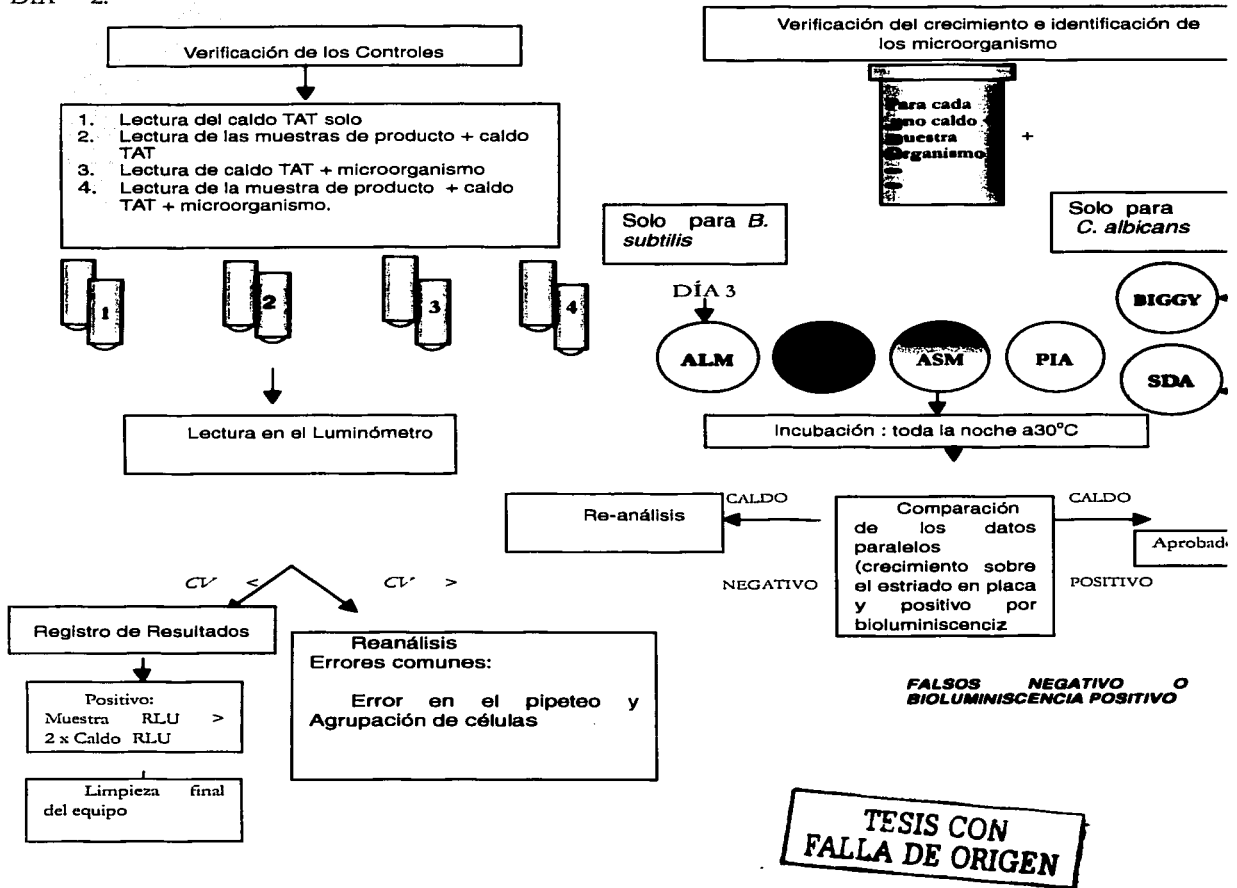
3 lotes por Producto de prueba, con cada uno de los 5 microorganismos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMA K: LECTURA DE LAS MUESTRAS

DÍA 2:



6.5 ESTUDIO EN PARALELO ENTRE EL MÉTODO TRADICIONAL MICROBIOLÓGICO Y EL MÉTODO DE BIOLUMINISCENCIA.

Pruebas en Paralelo

Para cada producto se probaron tres muestras / día de producción para un total de 10 días continuos de producción. Esto es un total de 30 muestras por cada fórmula

6.5.1 Método de Bioluminiscencia. Día uno.

- i. **Bioluminiscencia:** Por cada muestra, asépticamente se pesó 1 g de producto en 99 ml de Caldo TAT en un contenedor de plástico estéril (asegurando de cerrar bien la tapa). Posteriormente se incubó con agitación a 32.5°C, a 200-220 r.p.m. por 24 – 25 hrs. Asegurando que la agitación no causara salpicaduras del caldo en la tapa de los contenedores . (Incluyendo un control de caldo de 50 ml – 100ml por cada frasco o matraz de medio usado.)

Verificación de los controles. Día dos

- ii. Después, se transfirieron alícuotas de 50 µl de las muestras de prueba incubadas por duplicado en dos tubos de lectura. Se colocaron los tubos dentro del Luminómetro y se hizo el corrimiento de las muestras. (Ver apéndice 9.10, Apéndice 9.11 y Apéndice 9.12)
- iii. Al terminar de leer las muestras, los inyectores se drenaron y se limpiaron, para evitar contaminación de las líneas del equipo

6.5.2 Método Tradicional: Para cada muestra se pesaron 10 g de muestra en 90 mL de caldo TAT. Las muestras se homogenizaron y se transfirieron a cajas petri de la siguiente manera: :

- a) 1.0 y 0.1 ml ,posteriormente se adicionaron 25 ml de ALM previamente atemperado a 46°C, incubando a 32°C por cuatro días .Se tomaron las lecturas calculando las UFC/g ,multiplicando las colonias contadas por el factor de dilución
- b) 1.0 ml a caja petri y adicionando aproximadamente 25 ml de SDA previamente atemperado a 46°C .Las cajas se incubaron a 22°C por cinco días .Se tomaron las lecturas, calculando las UFC/g ,multiplicando las colonias contadas por el factor de dilución
- c) 1.0 ml a tubo de ensaye que contiene 9 ml de caldo TAT. Incubando a 32°C por 48 hrs .Con una asa se estrió el contenido de cada tubo en ALM, ASM, AMK.. Incubando 48 hrs a 32°C . Bioluminiscencia- Día Dos.

DIAGRAMA L : MÉTODO DE PRUEBA. ESTUDIO EN PARALELO (MÉTODO TRADICIONAL Y MÉTODO DE BIOLUMINISCENCIA)

3 muestras / día de producción 10 días de producción = 30 muestras

MÉTODO DE BIOLUMINISCENCIA



1 gr de muestra



Incubación con agitación:
32.5 °C, 200-220 r.p.m., 24 horas
(que el caldo no salpique en la tapa)

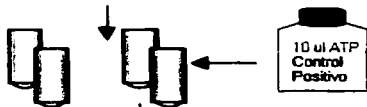
DÍA 2:

Reconstitución de los Reactivos

Limpieza y drenado de los
inversores del Luminómetro

Corrimiento de las pruebas de los
Controles positivo y negativo

50 µl Caldo
en cada uno



Medir las RLU en el Luminómetro

Registrar los resultados

MÉTODO TRADICIONAL

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



10 gr de muestra



1.0 ml

0.1 ml

1.0 ml



2X

2X

2X

Incubación a
32°C por 4 días

Incubación a
22°C por 5 días

Leer las placas y
calcular las UFC/gr
multiplicando las
colonias contadas
por el factor de
dilución

Leer las placas y
calcular las UFC/gr
multiplicando las
colonias contadas
por el factor de
dilución

Tubos de ensaye con 9 ml de
caldo TAT. Incubar a 32°C por
48hrs. Estriar el contenido de
cada tubo en ALM, ASM, McC

1.0 ml

Comparación de resultados

7.0 TABLAS DE RESULTADOS

TABLA 3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DEL ANALISTA

NO DE MUESTRA	LECTURA(RLU'S)	% C.V.	RESULTADOS	ESTRIADO EN AGAR
1	3359	8	NEGATIVO	NO CRECIO
2	3591	0.8	NEGATIVO	NO CRECIO
3	3509	1.6	NEGATIVO	NO CRECIO
4	4305	3.4	NEGATIVO	NO CRECIO
5	4305	3.6	NEGATIVO	NO CRECIO
6	4210	5.8	NEGATIVO	NO CRECIO
7	3465	6.5	NEGATIVO	NO CRECIO
8	4281	6.5	NEGATIVO	NO CRECIO
9	3600	6.1	NEGATIVO	NO CRECIO
10	4282	1.5	NEGATIVO	NO CRECIO

TABLA 4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE BIOCARGA

DESCRIPCION		RESULTADO	% DE MUESTRAS NEGATIVAS	Observación microscópica
PRODUCTO PRUEBA 1	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 2	DE	NO CRECIMIENTO	99.0%	Bacilos Gram positivos
PRODUCTO PRUEBA 3	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 4	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 5	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 6	DE	NO CRECIMIENTO	99.0%	Bacilos Gram positivos
PRODUCTO PRUEBA 7	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 8	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 9	DE	NO CRECIMIENTO	100%	
PRODUCTO PRUEBA 10	DE	NO CRECIMIENTO	100%	

*En cada categoría de producto se analizaron 100 muestras distribuidas en 5 días de producción.

Cada muestra fue reportada como positiva cuando un crecimiento de microorganismos fue observado y como negativo cuando no se observó crecimiento sobre las placas estriadas. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

TABLA 5. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 1

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	6491
6463	6519	-----	-----	-----	1965779
193941	199214	-----	-----	-----	53
3	5	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16}{000} (B - A) \quad \boxed{43} \text{ picomolar}$$

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \quad \boxed{137} \%$$

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16}{000} (D - C) \quad \boxed{53} \text{ picomolar}$$

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 6. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 2

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	-----
6399	6232	-----	-----	-----	6315.5
195402	186911	-----	-----	-----	1911567.
0	5	-----	-----	-----	5
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\ 000}{(B - A)} \times$$

43 picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \times$$

133 %

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\ 000}{(D - C)} \times$$

53 picomolar

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

TABLA 7. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 3

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	
5449	5486	-----	-----	-----	5467.5
174676	165067	-----	-----	-----	1698721
7	6	-----	-----	-----	.5
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\ 000}{(B - A)} \text{ picomolar}$$

43

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \%$$

118

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\ 000}{(D - C)} \text{ picomolar}$$

51

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 8. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 4

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	-----
4842	4510	-----	-----	-----	4676
158235	149322	-----	-----	-----	1537787
2	2	-----	-----	-----	-----
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\,000}{(B - A)} \times$$

43 picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \times$$

107 %

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?
 No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\,000}{(D - C)} \times$$

48 picomolar

¿La muestra contiene ATP no microbiano?
 No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 9. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 5

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	4181.5
4167	4196	-----	-----	-----	1359501
9	3	-----	-----	-----	
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\ 000}{(B - A)} \times$$

43 picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \times$$

95 %

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\ 000}{(D - C)} \times$$

49 picomolar

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 10. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 6

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	-----
7396	7321	-----	-----	-----	7358.5
150400	149191	-----	-----	-----	1497959
0	7	-----	-----	-----	-----
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times}{16\ 000} (B - A) \quad \boxed{43} \text{ picomolar}$$

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times}{100} (B - A) \quad \boxed{104} \%$$

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times}{16\ 000} (D - C) \quad \boxed{78} \text{ picomolar}$$

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 11. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 7

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	-----
7885	8083	-----	-----	-----	7984
168111	162650	-----	-----	-----	1653807
5	0	-----	-----	-----	5
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\,000}{(B - A)} \times$$

43 picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \times$$

115 %

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\,000}{(D - C)} \times$$

77 picomolar

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 12. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 8

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	
6857	6498	-----	-----	-----	6677.5
138492	151845	-----	-----	-----	1451686
0	2	-----	-----	-----	
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\ 000}{(B - A)} \quad \boxed{43} \text{ picomolar}$$

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \quad \boxed{101} \%$$

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\ 000}{(D - C)} \quad \boxed{73} \text{ picomolar}$$

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 13. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 9

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	-----
7980	7290	-----	-----	-----	7635
154854	158316	-----	-----	-----	1565852.
1	4	-----	-----	-----	5
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16\,000}{(B - A)} \times$$

43 picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C) \times 100}{(B - A)} \times$$

109 %

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

No

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E) \times 16\,000}{(D - C)} \times$$

78 picomolar

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

No

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 14. RESULTADOS DEL EFECTO DE LA MUESTRA PARA EL PRODUCTO DE PRUEBA 10

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo + 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo + 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
3807	3900	-----	-----	-----	3854
141952	145256	-----	-----	-----	1436046
7	5	-----	-----	-----	
7040	7659	-----	-----	-----	7349.5
163835	163466	-----	-----	-----	1636509
0	8	-----	-----	-----	
53	43	45	49	48	48

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E) \times 16}{000 (B - A)}$$

picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C)}{100} \times 100$$

(B - A)

%

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

* Debe estar entre 25%-200%

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E)}{16\ 000} \times 100$$

(D - C)

picomolar

¿La muestra contiene ATP no microbiano?

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

RESULTADO DEL ESTUDIO: Prueba del efecto de la muestra aprobada

CONTROLES DE MEDIOS UTILIZADOS

Lote de caldo TAT: 090502-2
 Lote de reactivo liberador: 11060102
 Lote de enzima-sustrato: 13041201
 Lote de ATP : 41011201

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 15. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 1

RLU de tres lotes de producto														
	Letra Código	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CÉLULAS FORMADAS	UFC INOCULADAS	ALM	SDA	SDGY	AMM	MCC	RA	INFECCION	
Control SDA - TA	J20V	n.a	n.a	n.a	NEG	n.a	NC	NC	NC	NC	NC	n.a	n.a	
Muestra SDA - TA	n.a	4800	4500	4579	NEG	n.a	NC	NC	NC	NC	NC	n.a	n.a	
Código TA - B cepacia	#####	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo	
Código TA - C albacane	60257	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura	
Código TA - Pa aeruginosa	17660368	n.a	n.a	n.a	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde azul	Bacilo Gram negativo	
Código TA - S aureus	#####	n.a	n.a	n.a	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Grampositivos	
Código TA - B subtilis	215630	n.a	n.a	n.a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n.a	NC	NC	Bacilos Grampositivos	
Código TA - Muestra + B cepacia	n.a	2140126	2908734	2730564	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verdosa	Bacilo Gram negativo	
Código TA - Muestra + C albacane	n.a	215158	198456	174267	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura	
Código TA - Muestra - Pa aeruginosa	n.a	2579921	2912549	3277544	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde azul	Bacilo Gram negativo	
Código TA - Muestra + S. aureus	n.a	3212778	3154975	3055276	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Grampositivos	
Código TA - Muestra + B. subtilis	n.a	106236	120892	125458	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n.a	NC	NC	Bacilos Grampositivos	
FORMA DE SEÑALADO	44	44	44	44	NEG	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	
PARTE REACTIVO	58	51	51	51	NEG	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	
CONTROL ATP	452228	n.a	n.a	n.a	POS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	
CONTROL Código	4678	n.a	n.a	n.a	NEG	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	
Código - A	439142	n.a	n.a	n.a	POS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	

Métodos empleados

TA	1156217
ALBA	1506022
SDA	1506021
Apel	2805026
manitol	1306026
Mc CONKEY	0606023

Reactivos	No. de lote
Lumin ATE	1290121
Lumin EX	13041201
ATP	41011201

CLAVES:	
n/a	NO APLICA
POS:	POSITIVO
NEG:	NEGATIVO
NC:	NO CRECIO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 16. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 2

RLU de tres lotes de producto													
	Lectura Unidad	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CLAS POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALM	SCA	MGDY	ASM	Msc	PIA	TRECTOR
Control caldo "A"	3200	n/a	n/a	n/a	NEU	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
MUESTRA SOLA - TAT	n/a	4800	4500	4574	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Caldo TAT + B. capacia	>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	v	Colonias cremosas brillantes con borde irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con borde irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación levemente verdosas	Bacilo Gram negativo
Caldo TAT + C. elbancas	602057	n/a	n/a	n/a	POS	v	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Caldo TAT + Pa aeruginosa	17660368	n/a	n/a	n/a	POS	3	Colonias cremosas brillantes con borde irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con borde irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Caldo TAT + B. surusae	>>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	12	Colonias cremosas de borde liso de color amarillo	NC	NC	Colonias cremosas de borde liso de color amarillo	NC	NC	Cocos Grampositivos
Caldo TAT + B. subtilis	215630	n/a	n/a	n/a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bacilo Grampositivos
Caldo TAT + muestra - B. capacia	n/a	1236547	1458746 3	1235897	POS	v	Colonias cremosas brillantes con borde irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con borde irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación levemente verdosas	Bacilo Gram negativo
Caldo TAT + muestra - C. elbancas	n/a	245874	2587413	2478916	POS	v	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Caldo TAT + muestra - Pa aeruginosa	n/a	2457961 2	3214566 85	2896412 3	POS	8	Colonias cremosas brillantes con borde irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con borde irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Caldo TAT + muestra - S. aureus	n/a	3212578 6	3158475 2	3055476 2	POS	12	Colonias cremosas de borde liso de color amarillo	NC	NC	Colonias cremosas de borde liso de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Grampositivos
Caldo TAT + muestra - B. subtilis	n/a	136459	147523	146325	POS	440	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	NC	NC	NC	Bacilo Grampositivos
Fondo de luz de estudio	44	44	44	44	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Placa de reactivos	151	151	151	151	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de A.T.O	1452208	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de caldo	4616	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Caldo + A.T.P	2361140	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Medios empleados No. de lote
 TAT 110602-7
 M.A. 150602-3
 SCA 150602-1
 Agar sa y manitol 280502-6
 PIA 130602-6
 Mc CONKEY 060602-3

Reactivos No. de lote
 Lumin ATE 1200121
 Lumin EX 13041201
 ATP 41011201

CLAVES:
 n/a NO APLICABLE
 POS: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECHO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 17. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 3

RLU de tres lotes de producto													
	Las tres clases	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CELSOS POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALM	SDA	BBGY	ABM	SB/C	PLA	TINCION
Control cada TAT	3200	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Muestra sola = TAT	n/a	4860	4500	4574	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Celido TAT = B. cepaeae	*****	n/a	n/a	n/a	POS	4	Colonias cremosas brilantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación igualmente verduosa	Saco Gram negativo
Celido TAT = C. sibacane	602057	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levedura
Celido TAT = Pe serugineae	17050088	n/a	n/a	n/a	POS	8	Colonias cremosas brilantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Saco Gram negativo
Celido TAT = S. aureus	*****	n/a	n/a	n/a	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas, de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Grampositivos
Celido TAT = B. subtilis	215630	n/a	n/a	n/a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Sacos Grampositivos
Celido TAT = B. cepaeae	n/a	13652303	*****	*****	POS	4	Colonias cremosas brilantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación igualmente verduosa	Saco Gram negativo
Celido TAT = C. sibacane	n/a	1397905	38507	66238	POS	4	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levedura
Celido TAT = Pe serugineae	n/a	*****	15300658	15362371	POS	8	Colonias cremosas brilantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Saco Gram negativo
Celido TAT = muestra = S. aureus	n/a	45023	7922367	9935692	POS	2	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Grampositivos
Celido TAT = muestra = B. subtilis	n/a	*****	*****	*****	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Sacos Grampositivos
BIANC 39 BACILES	151	151	151	151	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
CONTROL DE A.T.P.	0452286	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
CONTROL DE CELIDO	4014	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
CELIDO = A.T.P.	23874	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Medios
empleados

No. de lote

"A" 110602-7
MLA 150602-2
SDA 150602-1
Agar sal y
mandi: 290502-6
PLA 130602-9
MC CONKEY
Reservado 060602-3

No. de lote

Lumin ATE 1201121
Lumin EX 13041201
ATP 41011201

CLAVES:

n/a NO APLICA
POS: POSITIVO
NEG: NEGATIVO
NC: NO CRECIO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 18. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 4

RLU de tres lotes de producto													
	Letra única	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CELSA POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALM	SDA	SGGY	ASS	MeC	RA	TRACCIÓN
Controlado TA	3200	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Muestra sola - TA	n/a	4800	4500	4579	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Cuido TA1 - B. cepacia	>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacho Uram negativo
Cuido TA1 - C. albicans	60207	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levedura
Cuido TA1 - P. aeruginosa	17640368	n/a	n/a	n/a	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacho Uram negativo
Cuido TA1 - S. aureus	>>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	12	Colonias conexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias conexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Grampositivos
Cuido TA1 - B. subtilis	215630	n/a	n/a	n/a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bachos Grampositivos
Cuido TA1 - muestra - B. cepacia	n/a	>>>>>	6618277	6711140	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacho Uram negativo
Cuido TA1 - muestra - C. albicans	n/a	23620	185804	224687	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levedura
Cuido TA1 - muestra - P. aeruginosa	n/a	>>>>>	6003117	6033496	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacho Uram negativo
Cuido TA1 - muestra - S. aureus	n/a	1113585	26135356	29222092	POS	12	Colonias conexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias conexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Grampositivos
TA2 - muestra - B. subtilis	n/a	>>>>>	236161	>>>>>	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bachos Grampositivos
Fondo de luz de estudio	44	44	44	44	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
blanco reactivo	151	151	151	151	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de ATC	6452206	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de ATC	4618	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de ATC	239814	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Muestras analizadas	No. de lote
TAT	116602-7
MLA	156602-2
SDA	156602-1
Agar SA y manido	280502-6
P A	130602-6
MS CONKEY	066602-3

CLAVES:

n/a	NO APLICA
POS:	POSITIVO
NEG:	NEGATIVO
NC:	NO CRECIO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 19. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 5

RLU de tres lotes de producto

	Lote Lotaje	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CELOS POS/NEG	UFC NOCLADAS	ALS	SCA	MOGY	ASM	SEC	PIA	YINCIÓN
Control Lote TAT	320L	n.a	n.a	n.a	NEG	n.a	NC	NC	NC	NC	NC	n.a	n.a
Muestra de TAT	n.a	480U	480U	487U	NEG	n.a	NC	NC	NC	NC	NC	n.a	n.a
Lote TAT - C. casearia	320L	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo
Lote TAT - C. albicans	602057	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas color café	de	NC	NC	Levadura
Lote TAT - Pa. aeruginosa	1760369	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Lote TAT - S. aureus	320L	n.a	n.a	n.a	POS	12	Colonias cremosas de bordes hace de amarillo	NC	NC	Colonias cremosas de bordes hace de color amarillo	NC	NC	Cocos Gram positivos
Lote TAT - B. subtilis	215630	n.a	n.a	n.a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n.a	NC	NC	Bacilos Gram positivos
Lote TAT - Muestra - C. casearia	n.a	320L	6018277	6711146	POS	7	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo
Lote TAT - Muestra - C. albicans	n.a	320L	3389634	6489125	POS	7	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Lote TAT - Pa. aeruginosa	n.a	144090	198961	429360	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Lote TAT - Muestra - S. aureus	n.a	320L	320L	320L	POS	12	Colonias cremosas de bordes hace de color amarillo	NC	NC	Colonias cremosas de bordes hace de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Gram positivos
Lote TAT - B. subtilis	n.a	1762968	1762240	27383844	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n.a	NC	NC	Bacilos Gram positivos
Control de reproducción	44	44	44	44	NEG	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Blanco	50	50	50	50	NEG	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de reproducción	4452286	n.a	n.a	n.a	POS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de reproducción	4670	n.a	n.a	n.a	NEG	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de reproducción	2278742	n.a	n.a	n.a	POS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a

Muestras empacadas
 TAT 110602-7
 M.A 150602-2
 SCA 150602-1
 Agar sa. y 280502-6
 Mando 130602-6
 PIA 130602-6
 Mc CONKEY 060602-3

Reactivos
 Luminate 1250121
 LumEX 13041201
 ATP 41011201

CLAVES:
 n/a NO APLICA
 POS: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECió

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 20. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 6

RLU de tres lotes de producto													
	Lectura única	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CELSA POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALM	SDA	BIODV	ABM	MeC	PIA	TRACCIÓN
Control Cero - A	3200	na	na	na	NEG	na	NC	NC	NC	NC	NC	na	na
Muestra sola - AT	na	4800	4500	4579	NEG	na	NC	NC	NC	NC	NC	na	na
Ciclo AT - B cepacia	#####	na	na	na	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	na	NC	NC	Colonias incolores o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdoosa	Bacio gram negativo
Ciclo AT - C albicans	60207	na	na	na	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Ciclo AT - Pa seruginosa	1760368	na	na	na	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	na	NC	NC	Colonias incolores o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacio gram negativo
Ciclo AT - S. aureus	#####	na	na	na	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Grampositivos
Ciclo AT - B. subtilis	215630	na	na	na	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	na	NC	NC	Bacilos Grampositivos
Ciclo AT - muestra - B. cepacia	na	#####	219279	965597	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	na	NC	NC	Colonias incolores o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdoosa	Bacio gram negativo
Ciclo AT - muestra - C. albicans	na	247878	212525	206710	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Ciclo AT - muestra - Pa seruginosa	na	#####	9443824	28594578	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	na	NC	NC	Colonias incolores o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacio gram negativo
Ciclo AT - muestra - S. aureus	na	#####	2187922	1075754	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Grampositivos
Ciclo AT - muestra - B. subtilis	na	306923v	22623736	246063v	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	na	NC	NC	Bacilos Grampositivos
CPDCC de U2 de rodado	44	44	44	44	NEG	na	na	na	na	na	na	na	na
BIOPCC de 151 reactivos	151	151	151	151	NEG	na	na	na	na	na	na	na	na
CPDCC de A-1	6452296	na	na	na	POS	na	na	na	na	na	na	na	na
CPDCC de 4618	4618	na	na	na	NEG	na	na	na	na	na	na	na	na
CPDCC													
CPDCC - A72	278114	na	na	na	POS	na	na	na	na	na	na	na	na

Muestras empaquetadas
 -AT 110602-7
 MLA 150602-2
 SCA 150602-1
 Agar sal y 280502-6
 Mando PIA 130602-6
 Mc CONKEY 060502-3

Reactivos
 Lumina TE 1250121
 Lumina EX 13041201
 ATP 41011201

CLAVES:
 POS: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECIO
 na: NO APLICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 21. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 7

RLU de tres lotes de producto

	Lote número	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CLAS. POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALM	SDA	SDGV	AMB	MeC	PIA	VERDON	
Control caso "A"	3200	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a	
Muestra sola - "A"	n/a	4300	4300	4379	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a	
Caso "A" - B cepacia	>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	v	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias redondas o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacio Gram negativo	
Caso "A" - C silbacae	60457	n/a	n/a	n/a	POS	v	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	de	NC	NC	NC	Levadura
Caso "A" - Pa seruginosa	1760368	n/a	n/a	n/a	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias redondas o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacio Gram negativo	
Caso "A" - S sauruse	>>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	NC	Cocos Gram positivos
Caso "A" - B subtilis	215630	n/a	n/a	n/a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	NC	Bacios Gram positivos
Caso "A" - B cepacia	n/a	>>>>	23363182	32057195	POS	v	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias redondas o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacio Gram negativo	
Caso "A" - C silbacae	n/a	30308	w0777	15856	POS	v	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café		NC	NC	NC	Levadura
Caso "A" - Pa seruginosa	n/a	6861121	2461871	2375323	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias redondas o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacio Gram negativo	
Caso "A" - muestra - S. sauruse	n/a	>>>>	1386422	1726386	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	NC	Cocos en fascios Gram positivos
Caso "A" - muestra - B. subtilis	n/a	833421	32056w	747308	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	NC	Bacios Gram positivos
Fondo de luz de agua	44	44	44	44	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
BRNCE 39 reactivos	151	151	151	151	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
Control de A/D	452288	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
Control de C	4978	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
Control de A"	279740	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	

Muestras

Muestras	No. de lote
"A"	1109327
"A"	1566027
"A"	1506021
Apel. sal y manido	2805026
PIA	1306026
Mc DONKEY	0606023

Reactivos	No. de lote
Lumin ATE	120021
Lumin EX	13041201
ATD	41011201

 CLAVES:
 NEG: NO APLICHA
 POS: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECHO

FALLA DE ORIGEN

TABLA 22. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 8

RLU de tres lotes de producto													
	Lote único	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CÉLS POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALM	SDA	BIODY	ASM	McC	PIA	TINCION
Control caso TAT	3200	n.a	n.a	n.a	NEU	n.a	NC	NC	NC	NC	NC	n.a	n.a
Muestra sola - TA	n.a	4800	4500	4579	NEU	n.a	NC	NC	NC	NC	NC	n.a	n.a
Caso TAT - B. cepacia	4444	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verdeosa	Bacilo Gram negativo
Caso TAT - C. albicans	602057	n.a	n.a	n.a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Caso TAT - D. Pa aeruginosa	17660368	n.a	n.a	n.a	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Caso TAT - S. sursum	444444	n.a	n.a	n.a	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Grampositivos
Caso TAT - B. subtilis	215630	n.a	n.a	n.a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n.a	NC	NC	Bacilos Grampositivos
Caso TAT - B. muestra - B. cepacia	n.a	4444	2990374	2567657	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdeosa	Bacilo Gram negativo
Caso TAT - C. muestra - C. albicans	n.a	25694	17589	19921	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Caso TAT - D. muestra - D. Pa aeruginosa	n.a	7311427	2294444	4497813	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n.a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Caso TAT - muestra - S. sursum	n.a	4444	47785	50990	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en Gram positivos
Caso TAT - muestra - B. subtilis	n.a	54652659	54546521	5457498	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n.a	NC	NC	Bacilos Grampositivos
Control de AT	44	44	44	44	NEU	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de AT	151	151	151	151	NEU	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de AT	450228	n.a	n.a	n.a	POS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de AT	450228	n.a	n.a	n.a	NEU	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Control de AT	219874	n.a	n.a	n.a	POS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a

Medios empleados
 TAT 1106027
 ALA 1506022
 SDA 1506021
 Agar SA y 2805026
 muller PIA 1306026
 Mc CONKEY 0606023
Reactivos
 Lumin ATE 1290121
 Lumin EX 1304120
 ATP 41011201

CLAVES:
 n/a NO APLICA
 POS: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECIO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 23. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 9

RLU de tres lotes de producto

	Lectura Unidad	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CELEB POS/NEG	UFC NOCLUCADAS	ALM	SCA	SBGGY	AGM	Mac	PIA	Función
Control cado TAT	322C	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Muestra sola - TAT	n/a	4800	4500	4579	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a
Cuido "AT" - B. cepacia	>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo
Cuido "AT" - C. albacana	602057	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Cuido "AT" - Pa seruginosa	1760308	n/a	n/a	n/a	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Cuido "AT" - S. aureus	>>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	12	Colonias cremosas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias cremosas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Gram positivos
Cuido "AT" - B. subtilis	215830	n/a	n/a	n/a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bacilos Gram positivos
Cuido muestra - B. cepacia	n/a	>>>>>	15300656	15362371	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo
Cuido "AT" - C. albacana	n/a	175682	211155	365597	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café	NC	NC	NC	Levadura
Cuido "AT" - Pa seruginosa	n/a	>>>>>	>>>>>	>>>>>	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo
Cuido "AT" muestra - S. aureus	n/a	>>>>>	792237	961696	POS	12	Colonias cremosas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias cremosas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Gram positivos
Cuido "AT" muestra - B. subtilis	n/a	12323554	15696977	21033601	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bacilos Gram positivos
SPDGC 3e - J de equipo	44	44	44	44	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Bacterio 3e factivos	151	151	151	151	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de AT	n/a	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Control de C	4518	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Cuido - AT	2298741	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

 Medio
emplicado

 No. de lote
 TAT 1106027
 M/A 1506027
 SCA 1506027
 Agar SA 2805024
 manitol PIA 1306026
 Mc CONKEY 0606023

 Reactivos
 No. de lote
 Lumina TE 1260121
 Lumina EX 13041201
 ATP 41011201

CLAVES:

 POS: NO APLICA
 NEG: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECIO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 24. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACION CON MICROORGANISMOS PRODUCTO DE PRUEBA 10

RLU de tres lotes de producto															
	Lotes de origen	LOTE A	LOTE B	LOTE C	CELAS POS/NEG	UFC INOCULADAS	ALB	SCA	EMSAV	ASA	ESC	PLA	YSKOR		
Control cada 72	J200	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a		
Muestra sola - TAT	n/a	4800	4500	4574	NEG	n/a	NC	NC	NC	NC	NC	n/a	n/a		
Caida TAT - B cepacia	>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares		NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo		
Caida TAT - C albicans	602057	n/a	n/a	n/a	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas color café	de	NC	NC	Levadura		
Caida TAT - B ferruginosa	17660368	n/a	n/a	n/a	POS	6	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares		n/a	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo		
Caida TAT - B aureus	>>>>>	n/a	n/a	n/a	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos Gram positivos		
Caida TAT - B subtilis	215630	n/a	n/a	n/a	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bacilo Gram positivos		
Caida TAT - muestra + B cepacia	n/a	>>>>	>>>>	>>>>	POS	9	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación ligeramente verdosa	Bacilo Gram negativo		
Caida TAT - muestra - C albicans	n/a	040549	212546	144644	POS	9	Colonias blancas mate circulares	Colonias blancas mate circulares	Colonias redondas de color café		NC	NC	Levadura		
Caida TAT - muestra - B ferruginosa	n/a	>>>>	>>>>	>>>>	POS	8	Colonias cremosas brillantes con bordes irregulares	n/a	NC	NC	Colonias incoloras o de color rosa pálido con bordes irregulares	Colonias cremosas redondas con pigmentación verde-azul	Bacilo Gram negativo		
Caida TAT - muestra - S. aureus	n/a	>>>>	>>>>	>>>>	POS	12	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Colonias convexas de bordes lisos de color amarillo	NC	NC	Cocos en racimos Gram positivos		
Caida TAT - muestra - B. subtilis	n/a	457E-10	599E-112 5	459E-107 4	POS	445	Colonias rugosas irregulares	NC	NC	n/a	NC	NC	Bacilo Gram positivos		
FONDOS DE JARQUE	44	44	44	44	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		
SERIES DE REACTIVOS	151	151	151	151	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		
CONTROL DE ATE	1452206	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		
CONTROL DE CASC	4618	n/a	n/a	n/a	NEG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		
Caida - ATP	2298147	n/a	n/a	n/a	POS	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		

Método	No. de lote
Amplificados	
TAT	110602-7
MLA	150602-2
SCA	150602-1
Agar SA y mantol DIA	280502-6
	130602-6
MC CONKEY	060602-3
Reactivos	No. de lote
Lumin ATE	126012*
Lumin EX	1304120*
ATP	41011201

CLAVES:
 n/a NO APLICA
 POS: POSITIVO
 NEG: NEGATIVO
 NC: NO CRECIO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 25. IDENTIFICACION DE *C.albicans*
Parámetros de Identificación
[Sistema API 20 C AUX]
 Identificación de levaduras

24h	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
48h	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
72h	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphae/ Pseudo- hyphae
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
		2			5			6			6			1			7			4	

Microorganismo identificado:
C. albicans

TABLA 26. IDENTIFICACION DE *S.aureus*
Parámetros de Identificación
[Sistema API Staph]
 Identificación de cocos Gram positivos

24h	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	
	0	GLU	FRU	MN	MAL	LAC	TRE	MA	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MD	NAG	ADH	URE	LSTR
				E			N			NIT						G					
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
		6			7			3			6			1			5			3	

Microorganismo identificado
 Pruebas primarias
 Catalasa (+): Coagulasa (+)
S.aureus

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

TABLA 27. IDENTIFICACION DE *Ps aeruginosa*

Parámetros de Identificación

[Sistema API 20NE]

Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores

24h	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
48h	NO ₂ N ₂																				
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MN	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
24h		1			1			5			4			5			7			5	
48h																					

Microorganismo identificado:

*Ps. Aeruginosa*TABLA 28. IDENTIFICACION DE *B.cepacia*

Parámetros de Identificación

[Sistema API 20NE]

Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores

24h	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
48h	NO ₂ N ₂																				
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MN	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
24h		0			0			6			7			5			7			7	
48h																					

Microorganismo identificado:

B. cepacia

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 29. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 1)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	4500	3000	< 10	<10	
2	2292	3000	< 10	<10	
3	2705	3000	< 10	<10	
4	2965	4500	< 10	<10	
5	2061	4500	< 10	<10	
6	1978	4500	< 10	<10	
7	2088	2500	< 10	<10	
8	2779	2500	< 10	<10	
9	2363	2500	< 10	<10	
10	2390	3650	< 10	<10	
11	2431	3650	< 10	<10	
12	3348	3650	< 10	<10	
13	1427	5960	< 10	<10	
14	954	5960	< 10	<10	
15	6214	5960	< 10	<10	
16	886	3950	< 10	<10	
17	2928	3950	< 10	<10	
18	3352	3950	< 10	<10	
19	3934	5500	< 10	<10	
20	4481	5500	< 10	<10	
21	590690	5500	< 10	<10	Bacilos Gram positivos
22	109159	7500	< 10	<10	Bacilos Gram positivos
23	1066660	7500	< 10	<10	Bacilos Gram positivos
24	5092	7500	< 10	<10	
25	3071	4250	< 10	<10	
26	3772	4250	< 10	<10	
27	3994	4250	< 10	<10	
28	4096	2970	< 10	<10	
29	4001	2970	< 10	<10	
30	3986	2970	< 10	<10	

- En el caso de las muestras 21,22,23 éstas son positivas porque las lecturas son dos veces mayor a la lectura del caldo control. Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos

No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/gr

Microorganismos objetables

Ausentes

CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 30. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 2)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo solo	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	1047	3000	< 10	<10	
2	1099	3000	< 10	<10	
3	1016	3000	< 10	<10	
4	652	4500	< 10	<10	
5	667	4500	< 10	<10	
6	615	4500	< 10	<10	
7	606	2500	< 10	<10	
8	2445	2500	< 10	<10	
9	1006	2500	< 10	<10	
10	1573	3650	< 10	<10	
11	4103	3650	< 10	<10	
12	884	3650	< 10	<10	
13	586	5960	< 10	<10	
14	637	5960	< 10	<10	
15	1219	5960	< 10	<10	
16	611	3950	< 10	<10	
17	1700487	3950	< 10	<10	<i>Bacilos Gram positivos</i>
18	1262	3950	< 10	<10	
19	556	5500	< 10	<10	
20	636	5500	< 10	<10	
21	884	5500	< 10	<10	
22	1235	7500	< 10	<10	
23	759	7500	< 10	<10	
24	1057	7500	< 10	<10	
25	679	4250	< 10	<10	
26	737	4250	< 10	<10	
27	753	4250	< 10	<10	
28	>>>	2970	< 10	<10	<i>Bacilos Gram positivos</i>
29	3045758	2970	< 10	<10	<i>Bacilos Gram positivos</i>
30	1080	2970	< 10	<10	

- En el caso de las muestras 17,28 y 29, éstas son positivas porque la lecturas son dos veces mayor a la lectura del caldo control. Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos
Microorganismos objetables

No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/gr
Ausentes

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 31. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 3)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	1504	3000	< 10	<10	
2	100803	3000	< 10	<10	Bacilos Gram positivos
3	3374	3000	< 10	<10	
4	3383	4500	< 10	<10	
5	3219	4500	< 10	<10	
6	3235	4500	< 10	<10	
7	4134	2500	< 10	<10	
8	2386	2500	< 10	<10	
9	3203	2500	< 10	<10	
10	3208	3650	< 10	<10	
11	4185	3650	< 10	<10	
12	3407	3650	< 10	<10	
13	3115	5960	< 10	<10	
14	4519	5960	< 10	<10	
15	2227	5960	< 10	<10	
16	2413	3950	< 10	<10	
17	2351	3950	< 10	<10	
18	2257	3950	< 10	<10	
19	7967	5500	< 10	<10	
20	3443	5500	< 10	<10	
21	4718	5500	< 10	<10	
22	3428	7500	< 10	<10	
23	2316	7500	< 10	<10	
24	2029	7500	< 10	<10	
25	2663	4250	< 10	<10	
26	2398	4250	< 10	<10	
27	2311	4250	< 10	<10	
28	2305	2970	< 10	<10	
29	5016	2970	< 10	<10	
30	5415	2970	< 10	<10	

- En el caso de la muestra 2, ésta es positiva porque la lectura es dos veces mayor a la lectura del caldo control. Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/g
 Microorganismos objetables Ausentes

TABLA 32. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 4)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	2124	3000	< 10	<10	
2	3453	3000	< 10	<10	
3	3498	3000	< 10	<10	
4	1582	4500	< 10	<10	
5	2649	4500	< 10	<10	
6	3684	4500	< 10	<10	
7	3963	2500	< 10	<10	
8	3818	2500	< 10	<10	
9	6635	2500	< 10	<10	
10	21923	3650	< 10	<10	Bacilos Gram positivos
11	4868	3650	< 10	<10	
12	4509	3650	< 10	<10	
13	4813	5960	< 10	<10	
14	3310	5960	< 10	<10	
15	7365	5960	< 10	<10	
16	3773	3950	< 10	<10	
17	5811	3950	< 10	<10	
18	4807	3950	< 10	<10	
19	3627	5500	< 10	<10	
20	3786	5500	< 10	<10	
21	3924	5500	< 10	<10	
22	3846	7500	< 10	<10	
23	6313	7500	< 10	<10	
24	3893	7500	< 10	<10	
25	4205	4250	< 10	<10	
26	5346	4250	< 10	<10	
27	5307	4250	< 10	<10	
28	5116	2970	< 10	<10	
29	2650	2970	< 10	<10	
30	3564	2970	< 10	<10	

En el caso de la muestra 10, ésta es positiva porque la lectura es dos veces mayor a la lectura del caldo control. Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/g
Microorganismos objetables Ausentes

TABLA 33. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 5)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	3515	3000	< 10	<10	
2	3395	3000	< 10	<10	
3	3258	3000	< 10	<10	
4	4122	4500	< 10	<10	
5	4253	4500	< 10	<10	
6	4241	4500	< 10	<10	
7	4205	2500	< 10	<10	
8	4400	2500	< 10	<10	
9	4515	2500	< 10	<10	
10	4481	3650	< 10	<10	
11	4657	3650	< 10	<10	
12	2516	3650	< 10	<10	
13	2303	5960	< 10	<10	
14	2356	5960	< 10	<10	
15	2706	5960	< 10	<10	
16	2610	3950	< 10	<10	
17	8152	3950	< 10	<10	
18	8307	3950	< 10	<10	
19	2201	5500	< 10	<10	
20	2246	5500	< 10	<10	
21	2258	5500	< 10	<10	
22	2425	7500	< 10	<10	
23	2650	7500	< 10	<10	
24	2860	7500	< 10	<10	
25	3529	4250	< 10	<10	
26	4340	4250	< 10	<10	
27	4240	4250	< 10	<10	
28	3775	2970	< 10	<10	
29	3707	2970	< 10	<10	
30	3395	2970	< 10	<10	

- Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos

No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/gr

Microorganismos objetables

Ausentes

TABLA 34. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 6)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	1629	3000	< 10	<10	
2	1662	3000	< 10	<10	
3	1724	3000	< 10	<10	
4	2097	4500	< 10	<10	
5	2139	4500	< 10	<10	
6	2095	4500	< 10	<10	
7	4799	2500	< 10	<10	
8	4940	2500	< 10	<10	
9	4925	2500	< 10	<10	
10	3047	3650	< 10	<10	
11	3168	3650	< 10	<10	
12	3198	3650	< 10	<10	
13	3207	5960	< 10	<10	
14	3184	5960	< 10	<10	
15	2969	5960	< 10	<10	
16	3233	3950	< 10	<10	
17	3367	3950	< 10	<10	
18	3396	3950	< 10	<10	
19	3322	5500	< 10	<10	
20	3196	5500	< 10	<10	
21	3190	5500	< 10	<10	
22	3119	7500	< 10	<10	
23	4558	7500	< 10	<10	
24	4729	7500	< 10	<10	
25	4222	4250	< 10	<10	
26	3706	4250	< 10	<10	
27	3812	4250	< 10	<10	
28	3774	2970	< 10	<10	
29	4242	2970	< 10	<10	
30	4339	2970	< 10	<10	

- Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos
Microorganismos objetables

No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/
Ausentes

TABLA 35. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 7)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	2762	3000	< 10	<10	
2	2700	3000	< 10	<10	
3	5005	3000	< 10	<10	
4	5800	4500	< 10	<10	
5	4986	4500	< 10	<10	
6	5244	4500	< 10	<10	
7	3070	2500	< 10	<10	
8	2839	2500	< 10	<10	
9	3014	2500	< 10	<10	
10	2945	3650	< 10	<10	
11	3013	3650	< 10	<10	
12	3007	3650	< 10	<10	
13	2930	5960	< 10	<10	
14	3188	5960	< 10	<10	
15	3041	5960	< 10	<10	
16	3081	3950	< 10	<10	
17	3088	3950	< 10	<10	
18	4413	3950	< 10	<10	
19	4451	5500	< 10	<10	
20	4744	5500	< 10	<10	
21	5498	5500	< 10	<10	
22	5590	7500	< 10	<10	
23	5707	7500	< 10	<10	
24	5994	7500	< 10	<10	
25	5642	4250	< 10	<10	
26	5835	4250	< 10	<10	
27	2708	4250	< 10	<10	
28	2916	2970	< 10	<10	
29	3003	2970	< 10	<10	
30	4655	2970	< 10	<10	

- Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbios

No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/g

Microorganismos objetables

Ausentes

TABLA 36. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 8)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	4818	3000	< 10	<10	
2	5158	3000	< 10	<10	
3	5300	3000	< 10	<10	
4	5435	4500	< 10	<10	
5	5481	4500	< 10	<10	
6	5468	4500	< 10	<10	
7	5735	2500	< 10	<10	
8	5761	2500	< 10	<10	
9	2540	2500	< 10	<10	
10	2679	3650	< 10	<10	
11	2681	3650	< 10	<10	
12	2627	3650	< 10	<10	
13	2691	5960	< 10	<10	
14	2660	5960	< 10	<10	
15	2420	5960	< 10	<10	
16	2666	3950	< 10	<10	
17	2355	3950	< 10	<10	
18	2321	3950	< 10	<10	
19	2245	5500	< 10	<10	
20	3121	5500	< 10	<10	
21	2662	5500	< 10	<10	
22	2558	7500	< 10	<10	
23	2224	7500	< 10	<10	
24	2569	7500	< 10	<10	
25	2478	4250	< 10	<10	
26	3698	4250	< 10	<10	
27	3214	4250	< 10	<10	
28	3212	2970	< 10	<10	
29	3652	2970	< 10	<10	
30	3452	2970	< 10	<10	

- Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos

No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/g

Microorganismos objetables

Ausentes

TABLA 37. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 9)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	4350	3000	< 10	<10	
2	4221	3000	< 10	<10	
3	4421	3000	< 10	<10	
4	4456	4500	< 10	<10	
5	4224	4500	< 10	<10	
6	4163	4500	< 10	<10	
7	4258	2500	< 10	<10	
8	4624	2500	< 10	<10	
9	4255	2500	< 10	<10	
10	4455	3650	< 10	<10	
11	4426	3650	< 10	<10	
12	4458	3650	< 10	<10	
13	4478	5960	< 10	<10	
14	4896	5960	< 10	<10	
15	2434	5960	< 10	<10	
16	2365	3950	< 10	<10	
17	2563	3950	< 10	<10	
18	2391	3950	< 10	<10	
19	2456	5500	< 10	<10	
20	2851	5500	< 10	<10	
21	2165	5500	< 10	<10	
22	2389	7500	< 10	<10	
23	2791	7500	< 10	<10	
24	2689	7500	< 10	<10	
25	2444	4250	< 10	<10	
26	2693	4250	< 10	<10	
27	2968	4250	< 10	<10	
28	3145	2970	< 10	<10	
29	3644	2970	< 10	<10	
30	3515	2970	< 10	<10	

- Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/g
 Microorganismos objetables Ausentes

TABLA 39. RESULTADOS DEL ESTUDIO ENTRE EL METODO TRADICIONAL Y EL DE BIOLUMINISCENCIA (PRODUCTO DE PRUEBA 10)

No de muestra	METODO DE BIOLUMINISCENCIA		METODO DE CUENTA EN PLACA		Observación microscópica
	Lectura de la muestra	Lectura del caldo control	Cuenta total aeróbica (UFC/gr)	Resultados del enriquecimiento (UFC/gr)	
1	3037	3000	< 10	<10	
2	3132	3000	< 10	<10	
3	3121	3000	< 10	<10	
4	3948	4500	< 10	<10	
5	3478	4500	< 10	<10	
6	3331	4500	< 10	<10	
7	3339	2500	< 10	<10	
8	3478	2500	< 10	<10	
9	3987	2500	< 10	<10	
10	3088	3650	< 10	<10	
11	3190	3650	< 10	<10	
12	3015	3650	< 10	<10	
13	4150	5960	< 10	<10	
14	4266	5960	< 10	<10	
15	4895	5960	< 10	<10	
16	4265	3950	< 10	<10	
17	4378	3950	< 10	<10	
18	4460	3950	< 10	<10	
19	4596	5500	< 10	<10	
20	3577	5500	< 10	<10	
21	3678	5500	< 10	<10	
22	3712	7500	< 10	<10	
23	3842	7500	< 10	<10	
24	3956	7500	< 10	<10	
25	3012	4250	< 10	<10	
26	3258	4250	< 10	<10	
27	3910	4250	< 10	<10	
28	3449	2970	< 10	<10	
29	4899	2970	< 10	<10	
30	11500	2970	10	<10	Bacilos Gram positivos

- Los resultados del método de cuenta en placa se expresan <10 debido a que el método detecta a partir de 10 UFC/gr

Especificaciones microbiológicas (50)

Microorganismos aeróbicos No mayor a 500 Unidades formadoras de colonia/g
 Microorganismos objetables Ausentes

8.0 DISCUSIÓN

8.1 Eficiencia del analista

En la tabla 3 se muestran los resultados del estudio de la eficiencia del analista. Los diez contenedores estuvieron libre de contaminación, ya que sobre las superficies de las placas estriadas no hubo ningún tipo de crecimiento y las lecturas del luminómetro estuvieron por debajo del valor de 10,000 URL. En el caso de que hubiera habido algún crecimiento en las placas, los resultados de este estudio se invalidarían, y por consiguiente se repetiría el estudio.

8.2 Análisis de Factibilidad

En la tabla 4 se muestran los resultados del estudio biocarga, encontrándose en todos los productos evaluados un porcentaje de re-análisis menor al 5%, por lo que el estudio se considera aceptable.

En el producto de prueba 2 y 6 se encontró un porcentaje de re-análisis del 1%; los microorganismos encontrados en ambos casos fueron bacilos Gram positivos. Las muestras correspondientes a estos reanálisis fueron evaluadas por el método de cuenta en placa para conocer el número de unidades formadoras de colonias por gramo, en ambos casos la cuenta total mesofílica aerobia estuvo dentro de las especificaciones microbiológicas. Un porcentaje de re-análisis mayor al 10% indica que el método de bioluminiscencia no es el adecuado para la evaluación microbiológica del producto, ya que frecuentemente se estaría analizando dos veces un producto por bioluminiscencia, apoyados de manera simultánea por el método de cuenta en placa, lo que para las plantas productivas resulta incosteable. Las medidas a tomar para hacer factible la utilización de la bioluminiscencia van enfocadas al mejoramiento de las condiciones de limpieza para la manufactura de cada producto.

8.3 Efecto de la muestra

En las tablas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 se muestran los resultados del estudio de validación del efecto de la muestra, para cada uno de los productos de prueba. En todos los casos las muestras demostraron no inhibir la reacción de bioluminiscencia, ni contener ATP de origen no microbiano, dicho de otra manera la concentración de ATP de las muestras fue menor de dos veces el valor de la concentración de ATP en el caldo sin ATP, y el porcentaje de respuesta para ATP está entre el 25% y 200%, por lo que se considera que todas las muestras evaluadas son aptas para analizarse por el método de bioluminiscencia.

8.4 Estudio de validación con microorganismos

En las tablas 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 se muestran los resultados del estudio de validación con microorganismos, *P.aeruginosa*, *B.cepacia*, *S.aureus*, *C.albicans*, *B.Subtilis* para los 10 productos de prueba.

Se evaluaron por cada producto tres lotes diferentes por duplicado cada muestra. Los resultados mostrados son el promedio de los duplicados. Las lecturas se consideran positivas cuando el valor de RLU's de la muestra en dos veces mayor a la lectura en RLU's del caldo estéril solo. En las tablas en algunas muestras no se reportan valores de RLU's, debido a que los resultados fueron muy altos ($>1 \times 10^8$ RLU's) y el equipo lo reporta como $>>>$ high background.

Con la finalidad de considerar los datos como válidos, el nivel de inóculo debe ser confirmado. La concentración del inóculo de al menos de 10 a 20 ufc/ml es aceptable. Para *B. subtilis* el nivel de inóculo debe de ser confirmado con 450 ufc/ml. Una concentración de inóculo >400 a <500 ufc/ml es aceptable. Si el nivel no es correcto, entonces los resultados no son válidos. Todos los inóculos preparados estuvieron dentro de los criterios antes mencionados.

Las características bioquímicas de cada microorganismo de prueba fueron verificadas a partir de las placas de verificación de los inóculos, y con el sistema microestandarizado API

8.5 Estudio en paralelo

En las tablas 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38 se muestran los resultados comparativos del método de bioluminiscencia y del método de cuenta en placa.

Los valores positivos por el método de bioluminiscencia son valores de RLU's dos veces la lectura del caldo TAT estéril sin muestra.

La muestra 30 del producto de prueba 10 mostrada en la tabla 38 indica que el método de bioluminiscencia resultó positivo y hubo crecimiento en la cuenta en placa, por lo que se evidencia la correlación de resultados.

Las muestras 21, 22, 23 del producto de prueba 1 mostrado en la tabla 29, las muestras 17, 28, 29 del producto de prueba 2 mostrado en la tabla 30, la muestra 2 del producto de prueba 3 mostrado en la tabla 38, la muestra 10 del producto de prueba 4 mostrado en la tabla 32, indican una lectura positiva por bioluminiscencia pero sin crecimiento en las placas de agar, esto es debido a que el método convencional es menos sensible. Si por el contrario hubiera crecimiento en las placas de agar y no hubiera lectura por el método de bioluminiscencia se estaría hablando de algún posible error en la metodología que debe de ser investigada y documentada.

Todas las muestras que fueron probadas como negativas por el método de bioluminiscencia fueron también negativas por el método convencional.

Las muestras que resultaron positivas por el método de bioluminiscencia fueron estriadas a partir del caldo sobre placas de agar Lethen modificado e incubadas a 32°C por 48 hrs. En todos los casos se encontraron bacilos Gram positivos.

La correlación de resultados entre ambos métodos está por arriba del 95 %, lo que indica una congruencia entre ellos. Un valor por debajo del 95% requiere un re-análisis de las mismas muestras, para determinar si los resultados discrepantes son a causa de un error experimental. En el caso que se determine que no es un error experimental, la validación deberá ser repetida.

9.0 CONCLUSIONES

La bioluminiscencia aplicada a la microbiología demostró ser un buen método de análisis , ya que se obtuvieron resultados comparables con los métodos tradicionales de cuenta en placa.

Esta metodología resulta ser muy útil en la industria , ya que con ello se disminuyen considerablemente los tiempos en que los productos se mantienen en las bodegas , esperando un dictamen , pero el requisito que tiene que tener la industria para la aplicación de la bioluminiscencia , es tener un control microbiológico que abarque toda la cadena productiva de los sistemas como pueden ser de manera genérica el agua, las materias primas, las áreas de operación, El personal que manufactura el producto, El aire de compresión, los equipos, con el fin de reducir la biocarga en el producto a analizar , ya que se trata de un método cualitativo.

Esta metodología deja de ser atractiva cuando constantemente se tiene que re-analizar un producto, pero el problema no radica en la técnica si no el ambiente en que el producto es elaborado, por lo que el trabajo del Químico farmacéutico Biólogo se debe enfocar a la detección de puntos que son críticos de contaminación microbiológica, estableciendo puntos de monitoreo y control , por consiguiente mejorando el proceso.(20)

Esta metodología aún cuando se lleve de manera rutinaria en la industria, no se puede dejar de aplicar los métodos cuantitativos de análisis microbiológicos , ya que cuando constantemente los resultados de bioluminiscencia indiquen altas lecturas es necesario saber la cuenta en placa y el tipo de microorganismo presente en el producto, para que con ello se establezcan planes de contingencia y se detenga una posible contaminación microbiológica de grandes magnitudes.

La selección de microorganismos de prueba es particular de cada industria,(a los que el producto es sensible , ya sea por su composición de ingredientes,su actividad de agua,o su pH) pero se deben de incorporar aquellos que por especificación se indiquen, más aquellos que estén presentes en los estudios de biocarga.

Cuando un producto se analiza por bioluminiscencia , hay que tener en cuenta que cuando existan cambios de formulación importante (Ingrediente activo, adición de un material, cambio de conservadores,...) , es necesario re-iniciar con el proceso de validación indicado en este trabajo, ya que puede haber inhibición del crecimiento de microorganismos presentes, obteniéndose con ello resultados erróneos.

10.0 APENDICE

10.1 Preparación de Caldo.

- i. Para la base de caldo TAT, pesar 25 g en 960 mL de agua destilada o desmineralizada de bajo contenido de ATP, adicionar 40 mL de Tween 20, calentar en un baño de agua 50-60 °C de 15-30 minutos con agitación constante hasta completa disolución.

Autoclavear el caldo TAT inmediatamente para minimizar el crecimiento de microorganismos que pudieran dar como resultado la liberación de ATP causando altas lecturas de la línea base. A 121°C 15 lbs/in2 durante 15 minutos. pH final de 7.2 +/- 0.2

- ii. Enfriar antes de su uso en baño de agua a 46°C. El caldo TAT puede ser almacenado a temperatura ambiente por no más de 7 días. Si el caldo TAT debe ser almacenado por un largo periodo debe ser refrigerado. 2-3°C

10.2 Agar nutritivo (AN)

suspender 23 g de polvo en un litro de agua desmineralizada o destilada, mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in2 durante 15 minutos. . Vaciar el número de placas requerido. pH final de 6.8 +/- 0.2

10.3 Agar soya tripticasa (AST)

Suspender 40 g en un litro de agua destilada o desmineralizada, mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in2 durante 15 . Ambos medios pueden ser ambientados en un baño de agua a 46°C el tiempo necesario antes de su uso. Vaciar el número de placas requerido. pH final de 7.3 +/- 0.2

10.4 Agar Letheen Modificado

Suspender 59.1 g en un litro de agua destilada o desmineralizada , mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in2 durante 15 minutos. . Vaciar el número de placas requerido. pH final de 7.2 +/- 0.2

10.5 Agar sales manitol

Suspender 111 g en un litro de agua destilada o desmineralizada, mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in2 durante 15 minutos. . Vaciar el número de placas requerido. pH final de 7.4 +/- 0.2

EST. Y TISSINO SALE
DE LA BIBLIOTECA

10.6 Agar para aislamiento de Pseudomonas (PIA)

Suspender 45g en 980 mL de agua destilada o desmineralizada, adicional 20 mL de glicerol, mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in² durante 15 minutos. . Vaciar el número de placas requerido. pH final de 7.0 +/- 0.2

10.7 Agar dextrosa sabouraud (SDA)

Suspender 65 g en un litro de agua destilada o desmineralizada, mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in² durante 15 minutos. . Vaciar el número de placas requerido. pH final de 5.6 +/- 0.2

10.8 Agar Biggy

Suspender 49 gr en un litro de agua destilada o desmineralizada mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. No autoclavar. Vaciar el número de placas requerido. pH final de 6.8 +/- 0.2

10.9 Agar MacConkey

Suspender 50 g en un litro de agua destilada o desmineralizada, mezclar y calentar con agitación constante hasta ebullición durante un minuto hasta completa disolución del polvo. Autoclavear a 121°C 15lbs/in² durante 15 minutos. . Vaciar el número de placas requerido. pH final de 7.1 +/- 0.2

Los medios de cultivo sólidos pueden ser almacenados a temperatura ambiente por no más de 7 días. Si las placas deben ser almacenadas por un período largo, refrigerarlas.

10.10 Solución Salina al 0.85%

Preparar la solución salina al 0.85% con agua destilada y ajustar a un pH de 6 – 7 usando NaOH 1N o HCl 1N

Dispensar suficientes cantidades en tubos con tapón de rosca. Esterilizar y enfriar a temperatura ambiente antes de su uso

10.11 Reactivos de bioluminiscencia

Los reactivos de bioluminiscencia son marca CELSIS. El kit de reactivos contiene:

- **Reactivo liberador de ATP LuminEx.** Listo para usarse
- **Reactivo de Bioluminiscencia, enzima –sustrato Luminate.**
- Vertir el contenido de la solución buffer de enzima-sustrato al vial que contiene el liofilizado de la enzima-sustrato. Tapar. Homogenizar suavemente sin llegar a agitar. Permitir que el reactivo reconstituido se atempere durante 15 minutos antes de su uso. Almacenar de 2-8°C
- **Reactivo de ATP positivo.**
- Vertir el contenido de la solución buffer de ATP al vial que contiene el liofilizado de ATP Tapar. Homogenizar suavemente sin llegar a agitar. Permitir que el reactivo reconstituido se atempere durante 15 minutos antes de su uso Almacenar a 2-8°C. Se recomienda que este reactivo re-constituido se coloque en alícuotas de tal forma que se congelen y sólo se deje en refrigeración 2-8°C la alícuota de trabajo.

- **Buffer de ATP y de enzima-sustrato.**
- **Ambos buffers están listos para usarse.**

Notas: Todos los reactivos de bioluminiscencia deben de estar almacenados a una temperatura de 2-8°C.

El complejo enzima-sustrato reconstituido expira en 5 días.

10.12 Ensayos previos a la lectura de las muestras por bioluminiscencia

- i. Encender el luminómetro 30 minutos antes de iniciar las lecturas de las muestras
- ii. Iniciar con el ensayo de verificación del equipo, "Fondo de luz", colocar 10 celdas de lectura vacías y limpias. Tomar lectura
- iii. Colocar las soluciones de lavado en los inyectores. Colocar 9 celdas de lectura en el luminómetro para drenar la solución.
- iv. Remover las soluciones de lavado de los inyectores y colocar las soluciones de enjuague. Drenar la solución de enjuague.
- v. Remover las soluciones de enjuague y colocar en un inyector la solución liberadora de ATP, y en el otro inyector el reactivo enzima sustrato.
- vi. Purgar los inyectores con las soluciones anteriores hasta que se haya removido la solución de enjuague. Retirar las celdas de lectura empleadas.
- vii. Continuar con la verificación del ensayo de "reactivos", colocando 2 celdas de lectura, iniciar corrida y leer RLU's de los reactivos de bioluminiscencia.
- viii. EL siguiente ensayo a verificar es el de control positivo llamado "Control de ATP". EL cual se realiza pipeteando 10 µl de reactivo de ATP por duplicado en celdas de lectura. Leer RLU's del control positivo.
- ix. Por último, el ensayo a verificar es el del control del caldo TAT empleado, el cual se hace pipeteando 50µl del caldo TAT por duplicado en celdas de lectura. Leer RLU's del caldo.
- x. Para leer las muestras se pipetea 50 µl del caldo TAT con la muestra a evaluar. Leer las RLU's de las muestras problema.
- xi. Para apagar el equipo, se quitan los reactivos de bioluminiscencia, se enjuagan y se lavan los inyectores con las soluciones correspondientes.

10.13 Parámetros de los ensayos de verificación.

ENSAYO	ESPECIFICACIONES DE OPERACIÓN(RLU'S)
1 Blanco de instrumento	<100
2 Blanco de reactivo	<700
3 Control de ATP	>1,000,000
4 Blanco de caldo TAT	<10,000
5 Lecturas de muestras por duplicado	> 2 veces la lectura del caldo solo

10.14 FORMATO Y FORMULAS PARA EL CALCULO DEL EFECTO DE LA MUESTRA

- A RLU del caldo solo
 B RLU del caldo - 10 ul de ATP
 C RLU de la muestra en el caldo
 D RLU de la muestra en caldo - 10 ul de ATP
 E RLU del fondo de luz del aparato

Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5	Promedio
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Concentración de ATP en el caldo (pM)

$$= \frac{(A - E)}{(B - A)} \times 16\,000$$

#DIV/0! picomolar

Respuesta al ATP* (%)

$$= \frac{(D - C)}{(B - A)} \times 100$$

#DIV/0! %

¿La muestra inhibe la reacción de bioluminiscencia?

* Debe estar entre 25%-200%

(B · A)

Concentración de ATP del producto (pM)

$$= \frac{(C - E)}{(D - C)} \times 16\,000$$

#DIV/0! picomolar

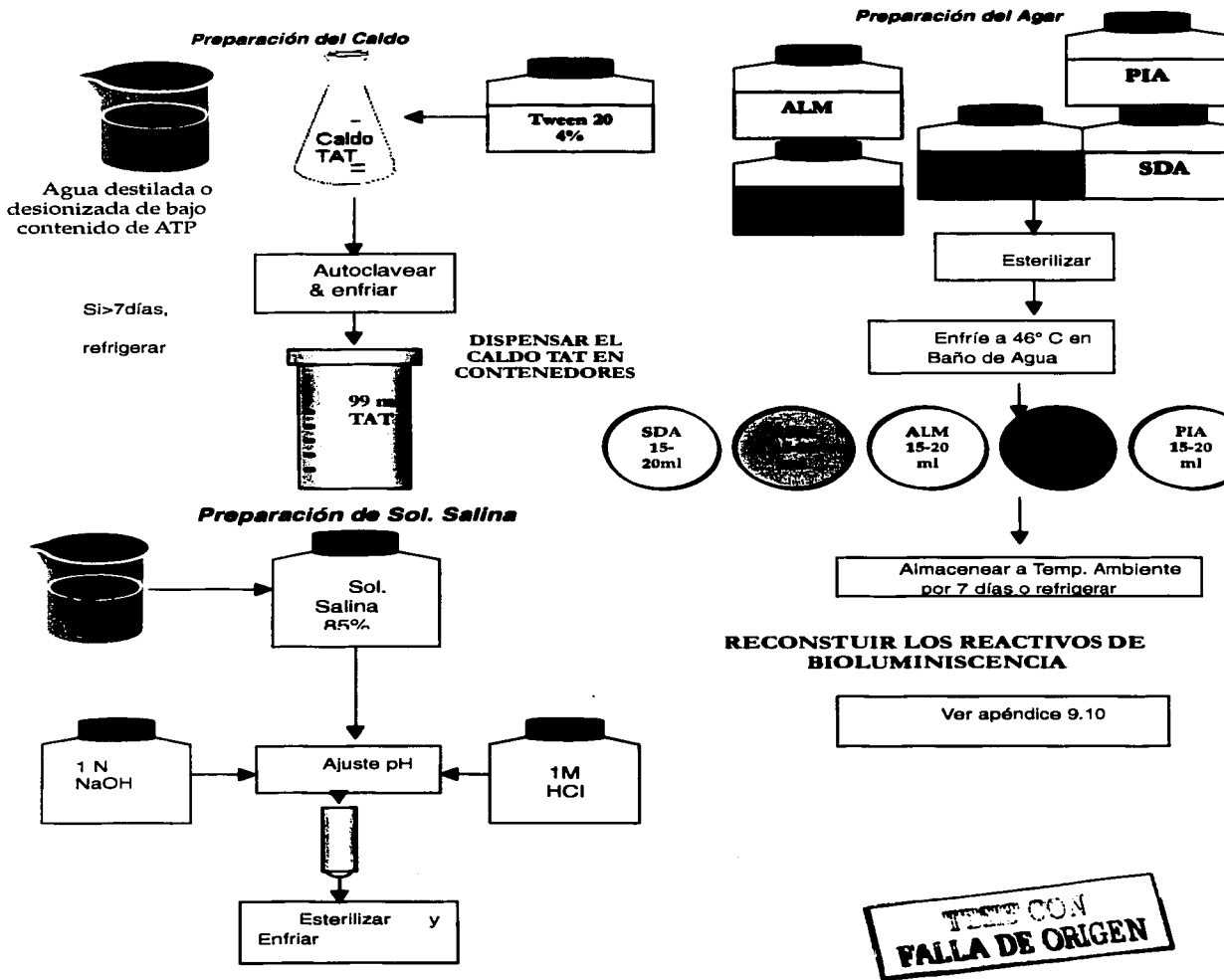
¿La muestra contiene ATP microbiano?

* Debe ser menor a 2 veces la concentración de ATP en el caldo

(D · C)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIAGRAMA M: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS PARA LA VALIDACIÓN CON MICROORGANISMOS INOCULACIÓN DE LAS MUESTRAS



11.0 GLOSARIO

Bioluminiscencia: Emisión de luz como resultado de una reacción química catalizadas por enzimas.

Fluorescencia/Fosforescencia: Donde la excitación la producen fotones de luz infraroja, visible o luz ultravioleta. Las moléculas son excitadas por radiación electromagnética, y emiten fotones al regresar al estado fundamental.

Eficiencia: Habilidad para realizar una tarea con la habilidad requerida

Eficiencia cuántica: La eficiencia cuántica (ϕ) se define como la relación entre el número o velocidad de moléculas luminiscentes y el número o velocidad de moléculas reactantes

Exposición de Placas: Placas de Agar que son dejadas abiertas en el ambiente por un período específico de tiempo. Los Microorganismos que circulan en el aire deberán caer sobre las placas. Los cuales son usados como un indicador de la contaminación del medio ambiente.

Filamento: Un delgado hilo de crecimiento. Una fibra que es larga y delgada.

Luminiscencia: Se presenta cuando una sustancia se excita energéticamente y después al regresar a su estado fundamental, disipa la energía absorbida en forma de luz. Existen varias formas de luminiscencia, las cuales difieren en la fuente de energía involucrada en la promoción o excitación de los electrones a un nivel de energía más alto.

Quimoluminiscencia: Emisión de luz como resultado de una reacción química. Ocurre cuando una molécula emite un fotón como resultado de una reacción química exergónica, en la cual uno de los intermediarios o productos finales se deja en un estado de excitación. Este fenómeno ocurre adiabáticamente y sin absorción de luz, ya que se requiere una gran cantidad de energía para producir un fotón (aproximadamente 200 kilojoules). La mayoría de las reacciones quimoluminiscentes son de tipo oxidativo.

Radioluminiscencia: Donde la excitación la realizan rayos beta o gamma.

Turbidez: Opaco. Un líquido turbio con una suspensión de partículas.

12 BIBLIOGRAFIA

- 1) Boeckx, R.L. 1984. Chemiluminescence: Applications for the Clinical laboratory. Human laboratory, 15:104
- 2) Whitehead, T.P., Kricka, L.J. and Carter, T.J. 1979 : Analytical luminiscence. Its potential in the clinical laboratory. Clinical chemistry, 25:1531.
- 3) Hastings, J.W. 1983 Biological diversity, chemical mechanism and the evolutionary origins of bioluminescent systems. J Mol Evol, 19:309
- 4) Mc Capra, F. 1973. Química de la bioluminiscencia . Endeavour, 32:139.
- 5) Gorus, F. and Schram, E. 1979. Applications of Bio- and Chemiluminescence in the clinical laboratory. Clin Chem, 25:512
- 6) Kricka, L.J. and Thorpe, G.H. 1983. Chemiluminescent and Bioluminescent method in Analytical chemistry. Analyst, 108:1274
- 7) Barnard, G.J., Kim, J.B., William, J.L and Colling, W.P. 1985. Recent advances in chemiluminescence immunoassay. Bioluminescence and Chemiluminescence instrument and applications. Chicago CRC press, Vol I page 151.
- 8) Suppan, Paul. 1994. Chemistry and light. England Royal Society of Chemistry. 184-235.
- 9) Kou, J.H., Schmidt, S.P and Schuster, G.B. 1978. Bioluminescence of firefly. Key steps in the formation of the electronically excited state for model systems. Proc Natl Acad Sci USA, 75:30
- 10) Lee, J. 1974. Bioluminescence. Photochem photobiol, 20:535.
- 11) McCapra, F. 1976. Chemical mechanism in bioluminescence. Acc Chem Res, 9:201.
- 12) White, E.H., Miano, J.D. and Umbreit, M. 1975. On the mechanism of firefly luciferin luminescence. J Am Chem Soc, 97:198.
- 13) Hastings, J.W. and Nelson, K.H. 1977. Bacterial Bioluminescence. Ann Rev Microbiol, 31:549.
- 14) Deluca, M. and McElroy, W.D. 1978. Chemiluminescence and bioluminescence. Methods Enzymol, 57:3
- 15) Mc Elroy, W.D. 1955. Cypridina and firefly luciferase. Methods Enzymol, 2:852..
- 16) American Society for Testing and Materials, Designation : D4012-81. 1990. Standard test method for adenosine triphosphate (ATP) content of micro-organisms in water
- 17) Bagshaw K. 1996. Using bioluminescence for end-product release in the cosmetics industry. Microbiology Europe 4(4):p.22-23
- 18) Connolly P, Bloomfield S.F, Denyer S.P. 1993. A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. J Appl Bacteriol, 75: 456-62
- 19) Davies A, Clements G, Derwent L, Brennan M 1995. A new rapid method for the detection of low level microbial contamination from brewing products. *In: Proceedings of the 25th Congress, European Brewing Convention, Brussels*. p.637-638
- 20) Easter M, Morris H 1996. Implementing HACCP in the manufacture of personal care products. Poster at CFTA conference, Atlanta, 1996
- 21) Easter MC. 1995. Rapid microbial methods - applications, trends and benefits. Food Tech Europe, Sept / Oct p. 76-84.
- 22) English D.J, Ignar R, Jiminez L, Reid W 1996. Rapid release of end-products using the Celsis PCP system- a novel microbial assay. Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide, p.246-251.
- 23) Gehle W, Presswood R., Stafford D.A 1990. The application of automated and sensitive luminometry for microbial detection in food and beverages and other applications using

- selective and stable biochemical procedures. *In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current status*, Eds. Stanley P.E., Kricka L.J. p. 437-440
- 24) Grant P. 1994. Rapid detection of micro-organism using Bioluminescence - A brief review. *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*, p.235-238
 - 25) Griffiths M.W. 1991. Rapid estimation of microbial numbers in dairy products using ATP technology. *In: Physical methods for Microorganisms Detection*. Ed. Nelson W.H. p. 47. CRC Press
 - 26) Griffiths, M.W. 1993 Applications of bioluminescence in the dairy industry. *J Dairy Sci.* **76**: 3118-25
 - 27) Griffiths MW 1996. The role of ATP bioluminescence in the food industry : new light on old problems. *Food Technology* June 1996, p. 62-72
 - 28) Jenkins S. 1988. Use of bioluminescent technology in the quality control of pharmaceutical products. Vortrag anlaBlich des CONCEP Symposions, Automatisierte mikrobiologische Verfahrenstechniken fur die pharmazuetische Industrie, p.80-86
 - 29) Jiminez J, Ignar R, Reid W, English D 1996 . Rapid detection of microbial contamination in dentifrice formulations using ATP bioluminescence assays. Poster No. Q 26, from the American Society of Microbiology meeting, 1996
 - 30) Kyriakides A. L 1992. ATP bioluminescence applications for microbiological quality control in the dairy industry. *Journal of the Society of Dairy Technology* **45** (4):91-93
 - 31) Kyriakides A.L, Costello S.M, Doyle,G, Easter M.C and Johnson I. 1991. Rapid hygiene monitoring using ATP bioluminescence. *In: Bioluminescence and Chemiluminescence : Current Status*. Eds. Stanley P.E and Kricka L.J.
 - 32) Le Coque J. 1996. The cost of quality. *Soap, Perfumery & Cosmetics*, February issue.
 - 33) Lundin A, Rickardsson A, Thore A 1976. Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Analytical Biochemistry*, **75**: 611-620
 - 34) McElroy W.D., DeLuca M. 1978. Chemistry of Firefly Luminescence. *In: Bioluminescence in Action*, Chapter 4, Ed. Peter J. Herring. Academic Press, London, New York, San Fransisco
 - 35) Meighan PJ, Ferguson D, Woods HJ, Foote N and Grant P 1994. Validation of a broad spectrum microbial extractant. *In: Bioluminescence and Chemiluminescence, Fundamentals and Applied Aspects*. p. 438-441, Eds. Campbell AK, Kricka LJ, Stanley PE.
 - 36) Morris H, Englishby M, Ferguson L, Wills K, Thomas B, Grant P 1996. An evaluation of ATP bioluminescence for the rapid detection of microbial contamination in non-sterile products. Poster No. Q 26, from the American Society of Microbiology meeting, 1996
 - 37) Nielsen P. and Van Dellen E 1989. Rapid bacteriological screening of cosmetic raw materials by using Bioluminescence. *J. Assoc. Off. Anal Chem.* **72** (5): 708-711
 - 38) Ogden K. 1993. Practical experiences of hygiene control using ATP bioluminescence. *Journal of the Institute of Brewing* **99**:389-393
 - 39) Ogie P 1997. ATP-bioluminescence : tomorrow's technology today? *Brewing & Distilling International*, April 1997, p.16-17.
 - 40) Olsen O 1991. Rapid food microbiology : Applications of bioluminescence in the dairy and food industry- A review. *In: Physical methods for Microorganism Detection*. Ed. Nelson W.H. p. 63-77, CRC Press
 - 41) Russell S. 1995. ATP bioluminescence: it's portable and real-time. *Broiler Industry*, August 1995, p. 18-23

- 42) Sala-Newby G.B, C.M. Thomson, and A.K. Campbell. 1996. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. *Biochem J.* **313**: 761-7
- 43) Seeger K. and Griffiths M.W 1994. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene monitoring in health care institutions. *Journal of Food Protection* **57**: 509-512
- 44) Stanley P.E 1989. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **4**: 375-380.
- 45) Stannard C.J, Gibbs P.A 1986. Rapid Microbiology : Applications of Bioluminescence in the food industry- a review. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1**: 3-10
- 46) Thomas B, Foote N, Morris H, Englishby M, Ferguson L, Todd A, Grant P 1994. Application of ATP Bioluminescence for the rapid detection and enumeration of microbial contamination in personal care products. *In: Bioluminescence and Chemiluminescence Fundamentals and Applied Aspects.* p. 466-469, Eds. Campbell AK, Kricka LJ, Stanley PE.
- 47) Ueda I, F. Shinoda, and H. and H. Kamaya. 1994. Temperature-dependent effects of high pressure on the bioluminescence of firefly luciferase. *Biophys J.* **66**:2107-10
- 48) Vanstaen H 1980. Applicability of bioluminescence for rapid detection of viable microorganisms. *Laboratory Practice, Dec Issue*, p.1281-1283
- 49) Murray, P., Kobayashi, G., Pfaller, M. and Rosenthal, K. 1997. *Microbiología Médica. 2a ed.* Harcourt Brace. España. pp 17-18.
- 50) *Leyes y códigos de México. Ley general de salud.* Ed 16. Tomo I. Editorial Porrúa. México, 2000. pp 387-392.